

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Patologia

Ana Paula Gomes dos Santos Miranda

**Envolvimento da proteína SOX3 na transição epitélio-mesênquima (TEM) em
linhagem celular de melanoma humano**

Belo Horizonte

2024

Ana Paula Gomes dos Santos Miranda

**Envolvimento da proteína SOX3 na transição epitélio-mesênquima (TEM) em
linhagem celular de melanoma humano**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Enio Ferreira

Coorientador (a): Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto

Belo Horizonte
2024

043 Miranda, Ana Paula Gomes dos Santos.
Envolvimento da proteína SOX3 na transição epitélio-mesênquima (TEM) em linhagem celular de melanoma humano [manuscrito] / Ana Paula Gomes dos Santos Miranda. – 2024.
59 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Enio Ferreira. Coorientador: Helen Lima Del Puerto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Melanoma. 3. Transição Epitelial-Mesenquimal. 4. Caderinas. I. Ferreira, Enio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 474 DE ANA PAULA GOMES DOS SANTOS
MIRANDA**

Realizou-se, no dia 31 de janeiro de 2024, às 14 horas, no formato on-line, Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada "**Envolvimento da Proteína Sox3 na Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) em Linhagem Celular de Melanoma Humano**", apresentada por **Ana Paula Gomes dos Santos Miranda** número de registro 2022660573, graduada no curso de Biomedicina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Amanda Maria Sena Reis**, ICB/UFMG; **Prof. Felipe Henrique de Souza Silva**, Instituto de Ensino e Pesquisa Santa Casa/BH; **Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto**, ICB/UFMG – **COORIENTADORA**; **Prof. Dr. Enio Ferreira**, ICB/UFMG – **ORIENTADOR**.

A Comissão considerou a Dissertação:

- APROVADA**
 REPROVADA

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2024.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 31/01/2024, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helen Lima Del Puerto, Membro de comissão**, em 31/01/2024, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Maria Sena Reis, Professora do Magistério Superior**, em 31/01/2024, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Henrique de Souza Silva, Usuário Externo**, em 02/02/2024, às 21:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2966491** e o código CRC **12B2ACF8**.

Dedico esse trabalho a minha família, mas principalmente a minha mãe Milvanda, graças a luta dela contra o câncer, hoje eu me dedico a estudar e pesquisar mais sobre essa doença.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar comigo, me dando forças, e me amparando todas as vezes que eu pensei em desistir. Sua graça me bastou para que eu conseguisse terminar essa nova etapa da minha vida.

Aos meus pais, Milvanda e Wanderley, por sempre me apoiarem, me dar suporte, me incentivarem, para que eu sempre possa viver meus sonhos. Amo vocês.

Aos meus avôs, Alair e Luzia, por sempre estarem presentes, e sempre serem meu suporte pra tudo que eu preciso. Amo vocês.

As minhas tias, que acreditam em mim sempre, mesmo quando eu sou a primeira a duvidar da minha própria capacidade. Amo vocês.

A minha família, por sempre acreditar que eu poderia chegar até aqui e me apoiar em todo o caminho. Amo vocês.

Ao meu orientador, Enio, que me acolheu mesmo sem me conhecer, e acreditou que eu poderia conquistar esse título. Obrigada por todas as vezes que me aconselhou, por todas as vezes que me incentivou a ser uma pesquisadora melhor. Obrigada por ter sido um ótimo ouvinte mesmo quando o assunto era pessoal.

A minha coorientadora, Helen, obrigada por todo conhecimento que você sempre esteve disposta a compartilhar, espero ser paciente com todos que eu precise ensinar, assim como você foi comigo.

Ao Laboratório do comportamento celular (LCC), que foi um lugar onde eu cresci e aprendi muito, e também a todas as pessoas que estavam presentes nessa jornada e sempre me incentivaram em todo o momento.

Um agradecimento especial, a Thacy, a Dai, a Stella, a Manu e ao Diego, que foram além de companheiros de laboratório, mas sim amigos que eu espero ter sempre ao meu lado. Vocês foram luz na minha trajetória no Lab, muito obrigada por me fazerem rir nos momentos difíceis, por me fazerem ver que tudo pode ter um lado feliz.

A minha família do coração, Bianca, Karen, Amanda e Gabriel, obrigada por me acompanharem por mais essa etapa, vocês são muito importantes na minha vida. Sou muito grata por toda vez que acreditaram no meu potencial, por toda vez que me ouviram reclamar que estava difícil, por todas as vezes que vocês cuidaram de mim, amo vocês.

Aos amigos que o mestrado me proporcionou, especialmente Mari, Leo e Gabi, vivemos esse momento caótico juntos, e foi ótimo ter vocês do meu lado nessa caminhada.

As minhas amigas, Luíza e Maria, que estão comigo a muito tempo, e sempre torceram e acreditaram em mim, leram tudo que eu escrevi, opinaram nos meus slides, mesmo quando não entendiam nada do assunto. Amo vocês.

Ao meu querido, Bryan, por ter me ensinando tanto quando estava na iniciação científica, e até durante o mestrado, você me inspira, e não me canso de dizer que quero ser como

você. Obrigada por acreditar que eu sou capaz, sua opinião sempre foi importante pra mim.

Aos meus amigos novos e antigos, especialmente Marcella, Rúbia, Júlia, Rafa, Camila, Lorena, Nath, Gabs, Davi, João, Junior, Bell, Lelê, Beatriz, Samuel, Arthur, Victor e todos os outros, obrigada por me acompanharem nessa jornada, vocês são muito importantes pra mim.

Agradeço a todos os professores que passaram pela minha vida, acredito profundamente no poder transformador da educação. E agradeço sinceramente por todo o empenho e dedicação e por tudo que me ensinaram.

Agradeço ao ICB e a UFMG, por todo suporte acadêmico, estrutura física e espaços de convivência. Por proporcionar essa experiência de conhecimento, formação e desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço as agências de fomento, principalmente a CAPES, que me concedeu a bolsa de mestrado, bem como às agências de fomento FAPEMIG e CNPq, pelo auxílio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Meu muito obrigado.

“Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela”. - Albert Einstein

RESUMO

O melanoma é uma forma altamente agressiva de câncer de pele, caracterizada por rápida progressão e extensa disseminação metastática. A transição epitélio-mesênquima (TEM) desempenha um papel fundamental no aumento da invasão e metástase do melanoma, e as proteínas da família SOX podem estar potencialmente envolvidas neste processo. Este estudo tem como objetivo investigar o papel do fator de transcrição SOX3 na TEM em células de melanoma humano. Para isso, a linhagem celular de melanoma humano SK-MEL-28 foi submetida à transfecção com um vetor de expressão SOX3 para avaliar o impacto na expressão dos marcadores TEM, na viabilidade celular e migração das células. Os ensaios com o método MTT revelaram que a expressão de SOX3 não afetou a viabilidade celular. A análise da expressão gênica, avaliada por qPCR, demonstrou regulação negativa da E-caderina e da N-caderina, e uma regulação positiva de Snail em células com maior expressão de SOX3. Ademais, no ensaio de cicatrização de feridas, a maior expressão de SOX3 reduziu a migração das células SK-MEL-28 em todos os tempos avaliados. Os achados deste estudo sugerem um papel potencial da proteína SOX3 na regulação da transição epitelial-mesenquimal (TEM) no melanoma. Foi observado que o SOX3 tem o potencial de regular genes associados a este fenômeno, sugerindo assim o envolvimento do SOX3 na progressão do melanoma e fornecendo insights sobre potenciais alvos terapêuticos para combater este câncer agressivo.

Palavras-chave: Melanoma; Transição Epitélio-Mesênquima; SOX3; N-caderina; E-caderina.

ABSTRACT

Melanoma is a highly aggressive form of skin cancer, characterized by rapid progression and extensive metastatic spread. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays a key role in increasing melanoma invasion and metastasis, and SOX family protein may be involved in this process. This study investigates the role of the transcription factor SOX3 in EMT in human melanoma cells. For this, the human melanoma cell line SK-MEL-28 was subjected to transfection with a SOX3 expression vector to evaluate the impact of expression on EMT markers, cell viability, and cell migration. Assays using the MTT method revealed that SOX3 expression did not affect cell viability. Gene expression analysis assessed by qPCR demonstrated downregulation of E-cadherin and N-cadherin, and upregulation of Snail in cells with higher expression of SOX3. Furthermore, in wound healing assays, SOX3 expression reduced the migration of SK-MEL-28 cells at all evaluated time points. The findings of this study suggest a potential role of the SOX3 protein in regulating the EMT in melanoma. It has been observed that SOX3 has the potential to regulate genes associated with this phenomenon, thereby elucidating the involvement of SOX3 in the progression of melanoma and providing insights into potential therapeutic targets to combat this aggressive cancer.

Keywords: Melanoma; Epithelial-Mesenchymal Transition; SOX3; N-cadherin; E-cadherin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A espessura do tumor é medida desde a superfície da pele até a parte mais profunda do tumor.	22
Figura 2 - A transição epitélio mesênquima no melanoma ocorre com a transformação da morfologia dos melanócitos para um fenótipo mais mesenquimal. A redução da expressão de marcadores epiteliais sugere uma perda de caráter similar ao epitelial, enquanto o aumento da expressão de marcadores mesenquimais facilitam a migração, invasão e metástase.....	25
Figura 3 - Classificação e estrutura da família SOX.	26
Figura 4 - Envolvimento da SOX em diferentes tumores. Onde as setas indicam a regulação de cada FT no tipo de neoplasia.	27
Figura 5 - Vetor de expressão pEF1/Myc-His utilizado para clonagem de SOX3.	31
Figura 6 - Expressão de SOX3 na linhagem SK-MEL-28. N marcador 100pb de DNA; SOX3 (126pb) ausência de amplificação; GAPDH (125pb) gene de referência; SOX3 Branco e GAPDH Branco controles negativo da reação de PCR, com ausência do template. Gel de poliacrilamida mostrando resultado da PCR convencional. 10 µL do resultado da PCR convencional foi pipetado no gel e visualizado por impregnação com nitrato de prata após eletroforese a 100V/50 minutos.	39
Figura 7 - Expressão de SOX3 avaliada por imunofluorescência na linhagem SK-MEL-28 após transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Células sem transfecção; B - Células transfectadas com o pEF1-vetor vazio; C - Células transfectadas com pEF1-SOX3. Fotomicrografias evidenciando a marcação nuclear para 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcação nuclear e citoplasma para SOX3 (FITC), e sobreposição das imagens (MERGE). As imagens foram adquiridas com auxílio de microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axio Vert.A1 no aumento de 400x.	40
Figura 8 - Intensidade de fluorescência da imunomarcação para SOX3 em linhagem SK-MEL-28 após transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. CTR - controle; CV - transfectado com o vetor vazio pEF1; SOX3 - transfectado com o vetor de expressão para SOX3. Quantificação da intensidade de fluorescência de SOX3 imunomarcada em células transfectadas para supressão de SOX3 e seus grupos controles. Resultado considerando Média ± DP, onde ***p<0,0004 SOX3 em relação ao grupo CTR, e **p<0,0060 SOX3 em relação ao grupo CV.	41

Figura 9 - Viabilidade células das células SK-MEL-28 transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. CTR - controle; CV - transfectado com o vetor vazio pEF1; SOX3 - transfectado com o vetor de expressão para SOX3. Percentuais de viabilidade celular, inferido a partir do método de MTT, na linhagem celular SK-MEL-28 transfectadas com o vetor para expressão de SOX3. Resultado considerando Média \pm DP, onde **** $p < 0,0001$ CV em comparação com CTR, e * $p < 0,0189$ SOX3 em comparação com CV..... 42

Figura 10 - Fotomicrografia das células SK-MEL-28, capturada antes e após a transfecção transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Células controle; B - Células transfectadas com o pEF1-vetor vazio; C - Células transfectadas com pEF1-SOX3. Ilustrando a viabilidade celular inalterada. Na imagem A observa-se o aumento da confluência, na imagem B observamos que após 24 de transfecção apresenta maior presença de debri celular e algumas células não aderidas, enquanto na imagem C observamos que após 24h de transfecção, além do aumento da confluência podemos ver a mudança da morfologia celular em comparação com 0h. Aumento de 5x, microscópio invertido (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany)..... 43

Figura 11 - Avaliação da expressão de genes associados a TEM na linhagem SK-MEL-28 após a transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Expressão de E-caderina, B - Expressão de N-caderina; C - Expressão de Snail. sendo CTR controle; SOX3 transfectado com o vetor de expressão para SOX3; A qPCR em tempo real foi expressa como Δ CT, que é o limiar do ciclo (Ct) do gene alvo menos o gene de referência, S18. A expressão gênica relativa foi calculada usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT$ do grupo transfectado menos o ΔCT do grupo controle. Os resultados de PCR em tempo real demonstraram menor expressão de mRNA de E-cad e N-cad e maior expressão de mRNA de Snail, comparando o grupo controle com o transfectado, sendo significativo $p < 0,05$ 44

Figura 12 - Expressão de e-caderina avaliada por imunofluorescência na linhagem SK-MEL-28 após transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Células controle; B - Células transfectadas com o pEF1-vetor vazio; C - Células transfectadas com pEF1-SOX3. Fotomicrografias evidenciando a marcação nuclear para 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcação nuclear e citoplasma para e-cad (FITC), e sobreposição das imagens (MERGE). As imagens foram adquiridas com

auxílio de microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axio Vert.A1 no aumento de 400x.....	45
Figura 13 - Expressão de n-caderina avaliada por imunofluorescência na linhagem SK-MEL-28 após transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Células controle; B - Células transfectadas com o pEF1-vetor vazio; C - Células transfectadas com pEF1 /MycHis. Fotomicrografias evidenciando a marcação nuclear para 4 ',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcação nuclear e citoplasma para n-cad (FITC), e sobreposição das imagens (MERGE). As imagens foram adquiridas com auxílio de microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axio Vert.A1 no aumento de 400x.....	46
Figura 14 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular utilizando as célula SK-MEL-28 após tranfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. Pode-se observar o fechamento da ferida nos tempos 0h, 12h, 24h e 36h, para os grupos controle (Control), transfectado com o vetor vazio (CV) e transfectado com vetor de expressão para SOX3 (SOX3). Ampliação de 5x, microscópio invertido (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany).....	47
Figura 15 - Avaliação da migração celular após transfeccão das células SK-MEL-28 com o pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. Control - controle; CV - transfectado com o vetor vazio pEF1; SOX3 - transfectado com o vetor de expressão para SOX3. Percentual de fechamento da ferida após 12, 24 e 36h da transfecção celular sendo significativo $p < 0,05$.....	48
Figura 17 - Amplificação do gene de S18. A qPCR foi feita em duplicata para cada grupo. A linha representa o CT.	58
Figura 18 - Amplificação do gene E-cad (CDH1). A qPCR foi feita em duplicata para cada grupo. A linha representa o CT.....	58
Figura 19 - Amplificação do gene N-cad (CDH2). A qPCR foi feita em duplicata para cada grupo. A linha representa o CT.....	59
Figura 20 - Amplificação do gene Snail. A qPCR foi feita em duplicata para cada grupo. A linha representa o CT.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primer para clonagem e condições de anelamento para SOX3.	31
Tabela 2 - Quantidade utilizada de cada reagente do kit Lipofectamine® para transfecção de acordo com o número de poços de cada placa.....	32
Tabela 3 - Primers utilizados na reação de PCR. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica dos genes alvos.	36
Tabela 4 - Primers utilizados na RT-qPCR. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica dos genes alvos.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitro
ANOVA	Análise de variância
ATCC	Do inglês “American Type Culture Collection”
CDH1	Gene da Caderina 1
CDH2	Gene da Caderina 2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Do inglês “Cycle Threshold”
DAPI	Dicloreto de diaminofenilindol (4’6-diamino-2-fenilindol)
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Enzima Desoxirribonuclease
ECAD	Gene E-caderina
EMT	Do inglês “Epithelial-mesenchymal Transition”
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FT	Fatores de transcrição
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GCO	Do inglês “Global Cancer Observatory”
GLB	Do inglês “Gel Loading buffer”
HMG-box	Do inglês “High Mobility Group”
IARC	Do inglês “International Agency for Research on Cancer”
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LCC	Laboratório do Comportamento Celular
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
Ng	Nanograma
NCAD	Gene N-caderina

nm	Nanômetro
OPTI-MEM	Reduced-Serum Medium - Meio Essencial Mínimo (MEM)
PA	Persulfato de amônio
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Enzima Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RPS18	Proteína ribossômica S18
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Transcrição reversa com reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	Transcrição reversa em cadeia da polimerase quantitativa
SFB	Soro fetal bovino
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma maligno
SNAIL	Do inglês “Family Transcriptional Repressor”
SOX	Do inglês “Sry-related HMG box”
Sry	Do inglês “Sex Determining Region Y”
T	Tumor
TBE	Tampão TRIS/BORATO/EDTA
TEM	Transição epitelial-mesênquima
TEMED	Agente polimetizante (NNN’N’tetra metil etileno diamina)
TME	Transição mesenquimal-epitelial
TNM	Classification of Malignant Tumors
UVR	Radiação ultravioleta
ZEB	Do inglês “Zinc-Finger E-box Binding”

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Melanoma	20
2.1.1	Epidemiologia	20
2.1.2	Diagnóstico	21
2.1.3	Estudos <i>in vitro</i> em melanoma.....	22
2.2	Transição epitélio-mesênquima	22
2.3	Família SOX	25
2.3.1	SOX3.....	27
3.	Justificativa	28
4.	Objetivos.....	28
4.1	Objetivo geral.....	28
4.2	Objetivos específicos	28
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1	Características do modelo experimental <i>in vitro</i>	29
5.2	Cultivo celular	29
5.3	Descongelamento e expansão das linhagens celulares	30
5.4	Vetor de expressão SOX3	30
5.5	Transfecção das células SK-MEL-28 com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His.....	31
5.6	Imunofluorescência em células transfectadas	32
5.7	Quantificação da fluorescência	34
5.8	Avaliação da viabilidade celular através do método MTT	34
5.9	Extração de RNA total com o vetor de expressão para SOX3	35
5.10	Transcrição reversa e PCR convencional	35
5.11	Eletroforese após a RT-PCR	36
5.12	Transcrição reversa e PCR em tempo real	36
5.13	Análise da PCR em tempo real	37
5.14	Ensaio de migração celular	38
5.15	Estatística.....	38
6	RESULTADOS	39
6.1	Avaliação da expressão gênica de SOX3 na linhagem SK-MEL-28.....	39

6.2	Imunofluorescência para SOX3 em células SK-MEL-28 transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3.....	39
6.3	Viabilidade celular em células transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3	41
6.4	Avaliação por PCR em tempo real da expressão de genes relacionados a TEM após a transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3	43
6.5	Imunofluorescência para E-caderina e N-caderina em células SK-MEL-28 transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3.....	44
6.6	Avaliação da migração celular após a transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis	46
7	DISCUSSÃO.....	49
8	CONCLUSÃO	52
9	REFERÊNCIAS.....	53
10	ANEXOS.....	58

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer de pele decorrente da proliferação excessiva de melanócitos alterados e é responsável por mais de 55 mil mortes por ano em todo o mundo (IARC, 2023). A taxa de sobrevivência em 5 anos para pacientes com melanoma é de 98% para tumores T1, enquanto pacientes com melanoma metastático têm uma taxa de sobrevivência em um ano de aproximadamente 75% (Bolick; Geller, 2021; Scolyer *et al.*, 2020).

O melanoma é um tumor altamente invasivo, classificado em estágios, determinado pelo nível de comprometimento das camadas da pele (Davis; Shalin; Tackett, 2019). Um evento significativo associado a esse comportamento invasivo é a Transição Epitélio-mesênquima (TEM).

A TEM induz alterações fenotípicas nas células epiteliais, causando a perda das junções célula-célula e da polaridade apical-basal. As células adquirem uma morfologia alongada semelhante a fibroblastos, aumentando suas capacidades migratórias e invasivas (Shibue; Weinberg, 2017). A TEM é frequentemente relacionada em células epiteliais, mas alterações fenotípicas também foram observadas em tumores neuroectodérmicos, como glioblastoma, neuroblastoma, que são semelhantes ao melanoma (Tang; Durand; Caramel, 2020).

A transição epitélio-mesênquima é uma via chave na diferenciação dos melanócitos neoplásicos, levando a um fenótipo mais invasivo, aumentando o potencial metastático e a resistência aos medicamentos (Ma *et al.*, 2023). O processo TEM é desencadeado por diferentes fatores de transcrição (FTs), como Snail1, Zinc finger E-box binding (ZEB) e proteínas da família Twist. Esses FTs podem suprimir direta ou indiretamente a expressão de marcadores epiteliais como E-caderina, Zo-1 e Claudina, ao mesmo tempo que promovem a expressão de marcadores mesenquimais como N-caderina, Fibronectina e Vimentina. (Shibue; Weinberg, 2017).

Pesquisas recentes confirmaram o papel significativo de outros fatores de transcrição na TEM. A família de fatores de transcrição HMG Box relacionada ao SRY (SOX) colabora com o Snail na promoção da TEM e invasão celular (Lamouille *et al.*, 2014). A família SOX compreende mais de 20 genes com funções diversas, agrupados em 8 categorias. Dentre essas classificações, existe um subgrupo conhecido como SoxB, subdividido em SoxB1 e SoxB2. SoxB1 inclui fatores como SOX1, SOX2 e SOX3, enquanto SoxB2 inclui SOX14 e SOX21 (Grimm *et al.*, 2020).

SOX3, membro do subgrupo SoxB1, é um fator de transcrição ligado ao cromossomo X e apresenta semelhança significativa com SRY (Castillo, Sanchez-Céspedes, 2012). Estudos indicam sua funcionalidade no câncer, podendo atuar como fator oncogênico, promovendo transformação em fibroblastos embrionários e comportamento maligno em diferentes tipos de tumores (Xia *et al.*, 2000). Também há evidências de um comportamento mais agressivo em alguns tumores específicos, como câncer de mama, carcinoma escamoso esofágico, glioblastoma e osteossarcomas (Guo *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2013; Vicentic *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022).

As descobertas recentes destacam a complexidade e o papel multifacetado de SOX3 na regulação, desenvolvimento, e contexto tumoral e, torna necessário estudos que investiguem o comportamento de células neoplásicas frente à maior ou menor expressão das proteínas da família SOX, em especial a proteína SOX3.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Melanoma

Os melanócitos, são células originadas da crista neural, são caracterizadas por serem células produtoras de pigmento (Wang *et al.*, 2022). São encontrados principalmente na epiderme e folículos pilosos da pele. Sua principal função é produzir grânulos de melanina (Belote *et al.*, 2021). A melanina é a responsável por determinar a cor da pele, olhos e outros, sendo responsável pela proteção contra radiação ultravioleta (UVR), por ser fotoprotetora para os tecidos (Li *et al.*, 2022). A mutação de genes específicos, como por exemplo BRAF, RAS, P53, nos melanócitos podem induzir a uma proliferação dessas células de forma alterada de modo que causem uma formação tumoral (Slominski *et al.*, 2022).

Sendo assim, o melanoma é um tipo de câncer de pele, que se dá por uma proliferação exacerbada desses melanócitos alterados (Bolick, Geller, 2021). É um câncer classificado em 5 categorias histológicas, que são: melanoma de propagação superficial, que está relacionado a uma exposição intermitente ao sol; melanoma nodular, mais comum no tronco e membros de pessoa a partir dos 60 anos; melanoma lentiginoso maligno, que está relacionado à exposição solar a longo prazo e envelhecimento; melanoma lentiginoso acral, afeta principalmente os dedos, palmas das mãos e planta dos pés; e melanoma desmoplásico, surge na cabeça e pescoço e pode ser amelanótico (Rastrelli *et al.*, 2014, Schadendorf *et al.*, 2015).

O melanoma é considerado uma doença multifatorial, podendo ter como fatores de risco: exposição a UVR, tipo de pele, bronzamento artificial, histórico genético, histórico anterior de nevos (Dzwierzynski, 2021). Além disso, a partir do sequenciamento do melanoma foi caracterizada uma classificação molecular para esse tipo de tumor. A classificação é feita a partir das mutações mais frequentes que são: BRAF, NRAS, RAS, KIT, P53, NF1 (Tímár; Ladányi, 2022).

2.1.1 Epidemiologia

Segundo as estimativas do Global Cancer Observatory (GCO), a incidência do melanoma em 2020 no mundo, em ambos os sexos e em todas as idades foi de 324.635 pessoas. Estima-se que até 2040 a incidência será de mais de 510 mil pessoas acometidas

pela doença. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o melanoma representa 4% das neoplasias de pele, a estimativa de novos casos no Brasil em 2022, foi de 8.980, em ambos os sexos. Enquanto em 2021, houve 1.832 mortes devido à doença. A taxa de sobrevivência em 5 anos para pacientes com melanoma é de 98% para tumores T1, na classificação TNM onde T indica a extensão do tumor, enquanto pacientes com melanoma metastático têm uma taxa de sobrevivência em um ano de aproximadamente 75% (Bolick; Geller, 2021; Scolye *et al.*, 2020).

2.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico do melanoma, se dá pelo conjunto das características clínicas em conjunto com a histopatologia e imuno-histoquímica (Elder *et al.*, 2020). As características clínicas são apresentadas pelo critério “ABCD”, que foi desenvolvido em 1985. O “ABCD” são siglas para: assimetria, bordas irregulares, variação de cor e diâmetro >6mm (Rastrelli *et al.*, 2014). Para caracterizar o tumor melanocítico, é utilizado marcadores imuno-histoquímicos, que não são expressos por outras linhagens celulares. Para marcação dos melanócitos é utilizado Melan-A, mas além desse marcador são indicados: SOX10; Ki-67; β -catenina (Teixido *et al.*, 2021).

Dentre as avaliações histológicas do melanoma, destaca-se o seu potencial invasivo local. O melanoma é um tumor altamente invasivo, com isso seu comportamento é classificado em 5 níveis, sendo o nível 1 as células permanecem na epiderme, no nível 2 há uma infiltração de ninhos celulares na derme, no nível 3 as células do melanoma se expandem na região papilar da derme, no nível 4 é quando ocorre uma invasão na derme reticular e no nível 5 ocorre uma invasão na gordura subcutânea (Figura 1) (Davis, *et al.*, 2019).

Na análise histopatológica utiliza-se de dois parâmetros sendo: o nível de Clark e o índice de Breslow. O nível de Clark, foi proposto em 1969, onde estratifica o tumor em cinco níveis, indicando invasão e correlacionando com a sobrevivência do paciente. Já o índice de Breslow, que foi proposto em 1970, mede a espessura do tumor em milímetros, relacionando-o à profundidade da célula neoplásica e também tem importância prognóstica (Balch *et al.*, 2001).

A categoria T (tumor), é dividida em 4 grupos sendo T1 a T4, e eles se baseiam na espessura do tumor e reflete também esse caráter invasivo. Cada categoria é subdividida em a e b, indicando a ausência ou presença de ulceração. Outros fatores prognósticos na

análise histopatológica são: o subtipo da lesão, se há presença de ulceração, índice de taxa mitótica, infiltração na derme e se há nódulos metastáticos em linfonodo (Scolyer *et al.*, 2020). Dentro desse comportamento invasivo, tem-se destacado o estudo do fenômeno de transição epitélio-mesênquima que induz alterações fenotípicas nas células epiteliais, causando a perda das junções célula-célula e da polaridade apical-basal. Na sequência as células adquirem uma morfologia alongada semelhante a fibroblastos, aumentando sua capacidade migratória e invasiva (Shibue; Weinberg, 2017).

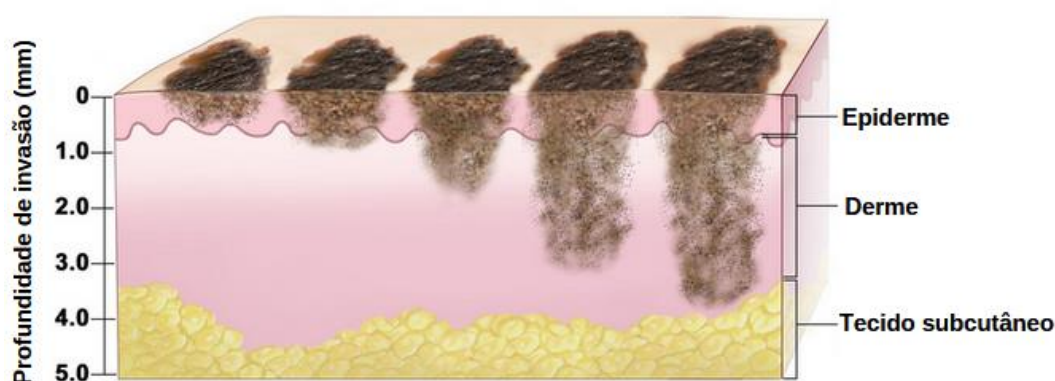


Figura 1 - A espessura do tumor é medida desde a superfície da pele até a parte mais profunda do tumor.

Fonte: Adaptado de Bethesda, MD: Instituto Nacional do Câncer.

2.1.3 Estudos *in vitro* em melanoma

O melanoma é uma das neoplasias mais estudadas, e para que seja feita a contribuição para redução e substituição dos experimentos *in vivo*, se tornou necessário sua pesquisa utilizando outras técnicas, como por exemplo as técnicas *in vitro*. Os estudos utilizando cultura de células imortalizadas tem sido importante para se obter uma maior compreensão da biologia dessa doença (Marconi *et al.*, 2018). Os modelos *in vitro* de melanoma, tem sido utilizado principalmente para caracterização genica e proteica, citotoxicidade, proliferação, imunossupressão e para ensaios de migração (Michielon, Gruijl, Gibbs, 2022).

2.2 Transição epitélio-mesênquima

Em 1980, surgiu a ideia que as células epiteliais podiam regular negativamente suas características e adquirir características de um fenótipo mesenquimal. Inicialmente

esse fenômeno foi descrito como “Transformação epitelial para mesenquimal” (Figura 2) (Lamouille *et al.*, 2014). Atualmente, esse fenômeno é conhecido como “Transição Epitélio-Mesênquima” (TEM), foi inicialmente identificado como um processo que ocorre durante a embriogênese. A TEM é ativada durante a gastrulação, onde as células se separam da camada epiblastica e migram para um local específico dentro do embrião (Debnath *et al.*, 2022).

No indivíduo adulto, essas mudanças morfológicas do processo da TEM, estão associadas a processos de cicatrização de feridas, na diferenciação de células, na progressão do câncer (Gonzalez; Medici, 2014, Zhang; Weinberg, 2018).

No câncer, a TEM pode estar associada a sinais específicos liberados por células estromais que compõem o microambiente tumoral (Shibue; Weinberg, 2017). A TEM, está associada à perda ou redução de expressão de genes como a E-caderina (E-CAD), molécula responsável pela adesão célula-célula, polaridade apical-basal. Esse evento, também é regulado por diversos Fatores de transcrição (FTs), RNAs não codificantes, moduladores epigenéticos (Chen *et al.*, 2017).

A E-caderina é uma importante molécula de adesão celular, expressa principalmente por células epiteliais, também possui mecanismos associados à supressão tumoral. Sua regulação negativa ou inativação é observada principalmente durante a progressão tumoral (Serrano-Gomez, Maziveyi, Alahari, 2016). No melanoma, a expressão dessa molécula de adesão além de ser responsável pela adesão das células, também auxiliam no contato funcional dos melanócitos em queratinócitos, e esse contato é um dos responsáveis por controlar a proliferação e a diferenciação de melanócitos (Johnson, 1999).

A N-caderina está ligada a características mesenquimais das células, e foi observado sua superexpressão principalmente em tumores invasivos e metastáticos. No que diz respeito à progressão tumoral, além de estar associado a um perfil mais mesenquimal, também está envolvida na apoptose e angiogênese (Kaszak *et al.*, 2020). A troca de caderinas é muito conhecida nos tumores epiteliais, isso ocorre quando há uma diminuição de E-cad e um aumento de N-cad. Mas, nos melanócitos, a N-cad pode ser regulada de forma independente, ou seja, sem que haja troca de caderinas, sendo assim, a regulação de uma pode não levar a alteração da outra caderina (Hao *et al.*, 2012).

Fatores de transcrição, são proteínas que se ligam em regiões específicas ou promotores para ativar ou reprimir a transcrição de um gene específico (Gilbert, 2000). Os FT's mais comumente associados ao fenômeno da TEM são, Snail (Family

Transcriptional repressor) e ZEB (Zinc-finger E-box Binding). Esses TFs regulam genes sendo por meio da ativação ou repressão desses genes, podendo suprimir direta ou indiretamente a expressão de marcadores epiteliais como E-caderina, Zo-1 e Claudina, ao mesmo tempo que promovem a expressão de marcadores mesenquimais como N-caderina, Fibronectina e Vimentina (Shibue; Weinberg, 2017).

A família Snail são fatores de transcrição que desempenham papéis na TEM. Sua ação como transcritor está envolvido na supressão da transcrição de E-caderina (Serrano-Gomez, Maziveyi, Alahari, 2016). No tumor, Snail é regulado por vários sinais que são encontrados no microambiente tumoral. Snail1, membro dessa família, está envolvido com indução de fenótipos metastáticos de câncer de mama e carcinoma hepatocelular (Gonzalez and Medici, 2014).

A TEM é frequentemente relacionada em células epiteliais, mas alterações fenotípicas também foram observadas em tumores neuroectodérmicos, como glioblastoma e neuroblastoma, que são semelhantes ao melanoma. Durante o desenvolvimento do embrião, as células da crista neural, da região do tronco, geram células diferentes, uma dessas células são os melanócitos. A migração dessas células envolve a participação de TFs, principalmente SNAIL2 (SLUG) e ZEB2 (Tang *et al.*, 2020).

A transição epitélio-mesênquima é uma via chave na diferenciação dos melanócitos, levando a um fenótipo mais invasivo, aumentando o potencial metastático e a resistência aos medicamentos (Ma *et al.*, 2023). A transição fenotípica do melanoma foi descrita a partir de duas alterações distintas, onde uma prolifera rapidamente e invade pouco, enquanto a outra prolifera pouco e invade muito (Pedri *et al.*, 2022).

Diversas interações no microambiente tumoral do melanoma, influenciam na sua transição para um melanoma mais agressivo e invasivo. Os melanócitos do tumor que adquirem características mais mesenquimal tendem a aumentar sua capacidade de migração, invasão, além de regular negativamente a apoptose (Pearlman *et al.*, 2017).

Pesquisas recentes confirmaram o papel significativo de outros fatores de transcrição na TEM, como por exemplo a família de transcritores SOX. Essa família de fatores de transcrição colabora com o Snail na promoção da TEM e invasão celular (Lamouille; Xu; Derynck, 2014).

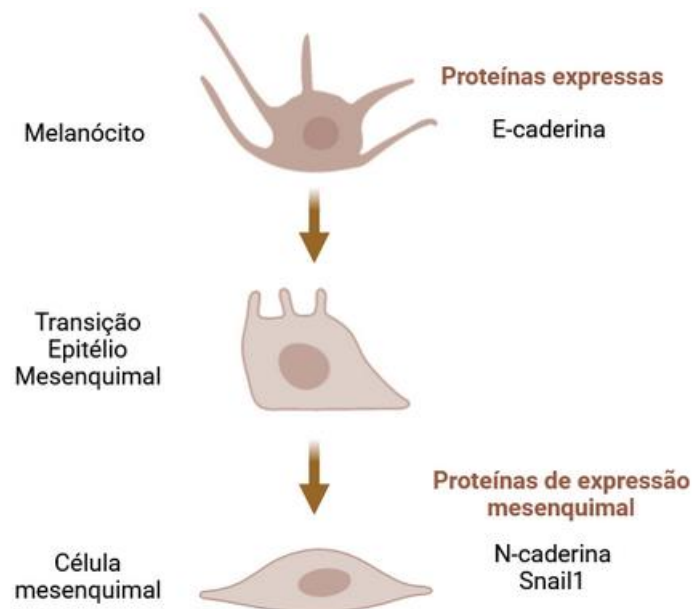


Figura 2 - A transição epitélio mesênquima no melanoma ocorre com a transformação da morfologia dos melanócitos para um fenótipo mais mesenquimal. A redução da expressão de marcadores epiteliais sugere uma perda de caráter similar ao epitelial, enquanto o aumento da expressão de marcadores mesenquimais facilitam a migração, invasão e metástase.

Fonte: Adaptado de: Pearlman, *et al.*, 2017.

2.3 Família SOX

A descoberta do gene Sex Determining Region Y (SRY) em 1990 foi de extrema importância para compreender o desenvolvimento dos testículos em mamíferos. Esse gene possui um domínio High Mobility Group (HMG-box), que se liga ao DNA em uma sequência específica. As proteínas que possuem 50% de semelhança de aminoácidos com o domínio HMG do SRY são denominadas proteínas Sry-related HMG box (SOX) (Sreenivasan *et al.*, 2022).

A família de fatores de transcrição (FT) SOX, contém mais de 20 genes, com diferentes funções que são classificados em 8 grupos de A-H, podendo ter subgrupo, como é o caso do grupo SoxB, que é subdividido em SoxB1 e SoxB2 (Grimm *et al.*, 2020), como pode-se ver na figura 3. Seus grupos, se baseiam na estrutura, perfil de expressão e semelhança entre as proteínas que são codificadas (Stevanovic *et al.*, 2021).

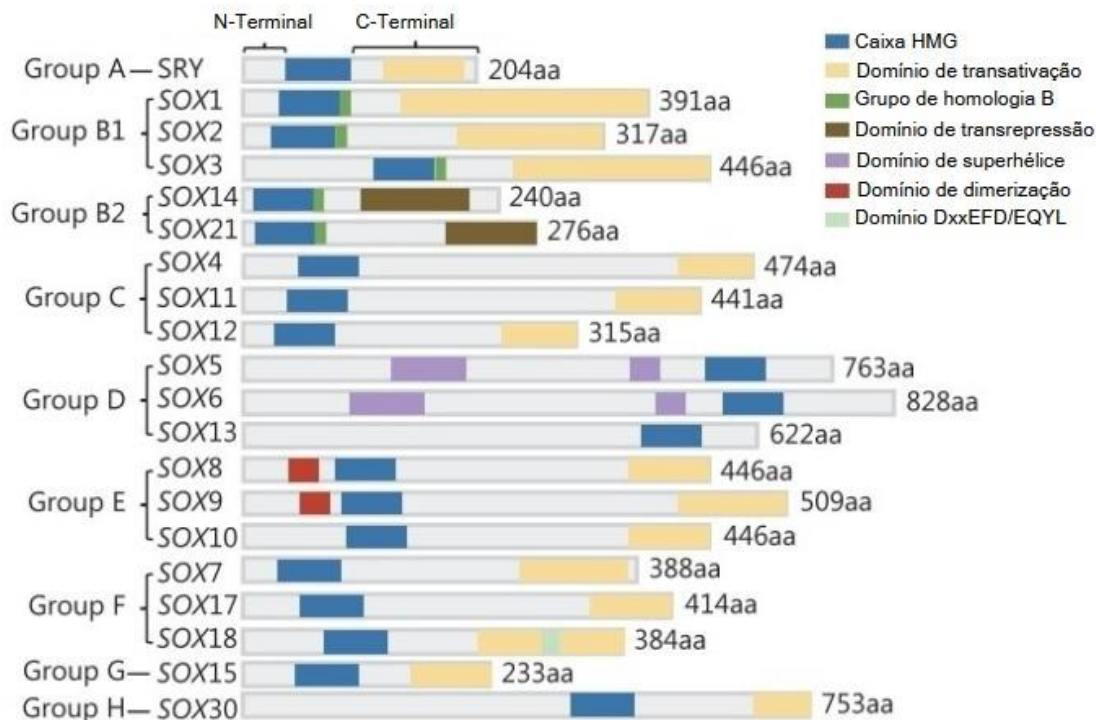


Figura 3 - Classificação e estrutura da família SOX.

Fonte: Adaptado de Hu *et al.*, 2019.

Os FTs da família SOX exercem funções únicas em diferentes células, além de regular diferentes eventos no mesmo tipo de célula (Stevanovic *et al.*, 2021). Através da modulação genética, SOX possui papel no destino celular desde a embriogênese até o adulto. Esses genes, estão envolvidos na homeostase tecidual, diferenciação celular, desenvolvimento do sistema nervoso central, determinação do sexo (Pouremamali *et al.*, 2022).

Apesar do papel fisiológico das proteínas membros da família SOX, quando há uma desregulação desses genes há implicações clínicas importantes. Sua mutação pode gerar má formação da estrutura do olho, retardo mental, dismorfia esquelética (Dong *et al.*, 2004). Além disso, esse FTs, são de extrema importância no desenvolvimento, progressão, invasão e metástase de alguns tipos de câncer (Dehshahri *et al.*, 2021).

Os membros da família SOX, podem atuar como oncogenes ou supressores de tumor. Em diversos tipos de câncer, podem regular a proliferação e diferenciação celular, apoptose, angiogênese, entre outros processos biológicos importantes (Figura 4) (Thu *et al.*, 2014). Dentre os grupos de fatores de transcrição SOX, encontramos o grupo SoxB, que é subdividido em SoxB1 e SoxB2. Sendo que o subgrupo SoxB1 inclui os fatores SOX1, SOX2 e SOX3, enquanto o SoxB2 inclui SOX14 e SOX21. Estudos que

investigaram o envolvimento do grupo SoxB1 em tumores, obtiveram resultados que indicaram que a superexpressão ou o silenciamento dessas proteínas, tem ação supressora ou promotora do tumor (Dong *et al.*, 2004).

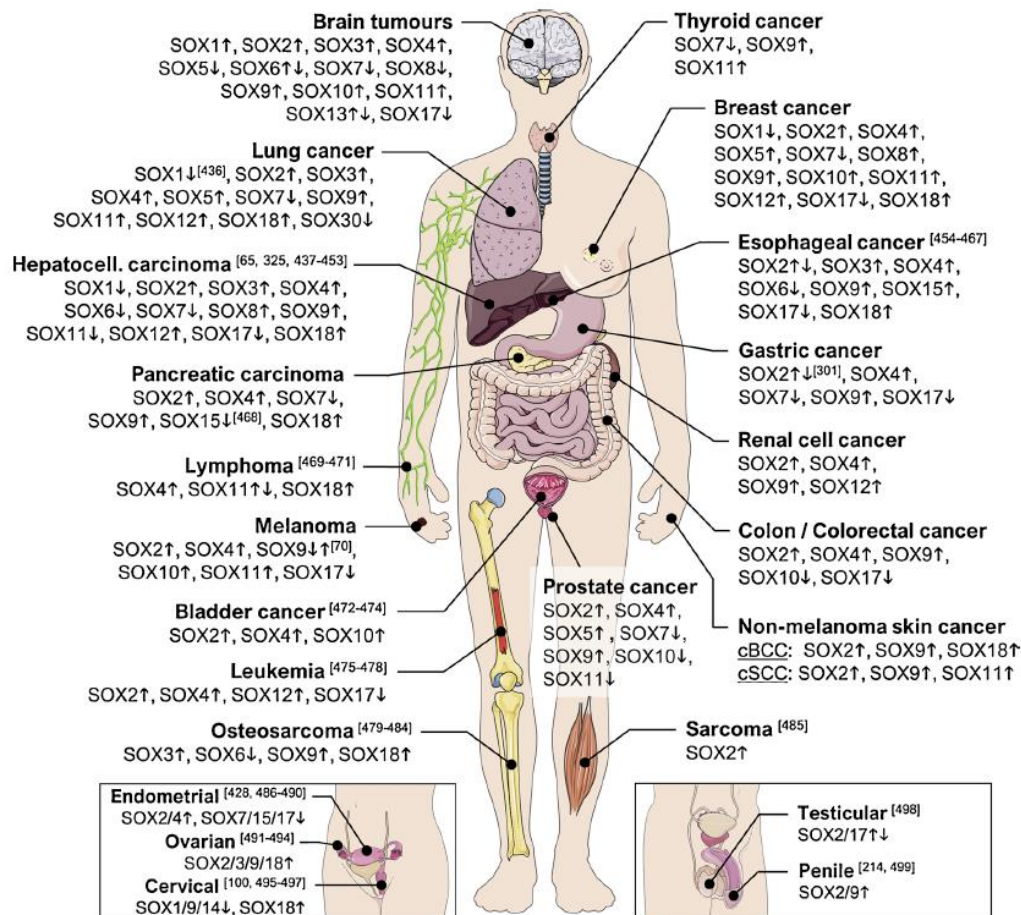


Figura 4 - Envolvimento da SOX em diferentes tumores. Onde as setas indicam a regulação de cada FT no tipo de neoplasia.

Fonte: Grimm, *et al.*, 2020.

2.3.1 SOX3

SOX3 está envolvido na formação do eixo hipotálamo-hipófise e do sistema nervoso central (Stevanovic *et al.*, 2021). Além disso, esse FT está envolvido em síndromes genéticas, condições de retardo mental, deficiência no hormônio do crescimento e pan-hipopituitarismo (Sreenivasan *et al.*, 2022). Por outro lado, a função de SOX3 não se limita apenas ao sistema nervoso central. SOX3 também atua na regulação positiva de vias apoptóticas (Dehshahri *et al.*, 2021).

Em 2000, Xia e colaboradores, demonstraram que SOX3 pode levar a uma transformação oncogênica de fibroblastos embrionários de galinha, podendo

desempenhar um papel na tumorigênese (Xia *et al.*, 2000). Além de um fator oncogênico, SOX3 pode ser direcionado para suprimir a progressão do câncer, podendo ser considerado um possível fator prognóstico no câncer (Abadi *et al.*, 2021). No entanto, estudos subsequentes associaram sua presença a um comportamento mais agressivo em tipos específicos de tumores, promovendo aumento da sobrevivência, migração e invasão celular (Grimm *et al.*, 2020).

Estudos em diferentes tipos de tumores, têm relatado alterações na expressão e função de SOX3. No câncer de mama, foi observado que o miR-483 pode suprimir a proliferação de células através do direcionamento do SOX3 (Cui *et al.*, 2019). Em carcinoma escamoso esofágico, foi visto que a superexpressão de SOX3 foi associado a metástases de linfonodo regional (Li *et al.*, 2013). No glioblastoma, observou-se que a expressão de SOX3 é maior do que em tecidos saudáveis, indicando que esse FT pode promover um comportamento maligno das células de glioblastoma (Vicentic *et al.*, 2018). Em osteosarcomas, foi visto uma relação entre Sox3 e Snail, podendo indicar que SOX3 seja um possível regulador da TEM (Qiu *et al.*, 2017).

3. Justificativa

O presente trabalho pode auxiliar na compreensão do fator de transcrição SOX3 e sua relação com a transição epitélio-mesênquima em tumores originados de melanócitos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Investigar a participação da proteína SOX3 na regulação da transição epitélio-mesênquima, em modelo *in vitro* de melanoma.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a expressão gênica de SOX3 em modelo *in vitro*, de células SK-MEL-28, por meio da técnica de RT-PCR.
2. Quantificar e imunolocalizar, a expressão da proteína SOX3, após a transfecção com vetor de expressão para SOX3 em modelo *in vitro* SK-MEL-28, por meio da técnica de imunofluorescência,

3. Determinar a viabilidade celular, em modelo *in vitro* SK-MEL-28, após transfecção com vetor de expressão para a proteína SOX3 pela técnica de MTT.
4. Quantificar a expressão de genes relacionados a TEM (E-caderina, N-caderina e Snail), em modelo *in vitro* SK-MEL-28, após transfecção com vetores de expressão para as proteínas SOX3, por meio da RT-qPCR,
5. Identificar a expressão das proteínas E-caderina e N-caderina, em modelo *in vitro* SK-MEL-28, após a transfecção com o vetor de expressão para a proteína SOX3, por meio da técnica de imunofluorescência,.
6. Quantificar a atividade migratória, em modelo *in vitro* SK-MEL-28, após a transfecção com o vetor de expressão para a proteína SOX3, por meio da técnica de ensaio de cicatrização de feridas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Características do modelo experimental *in vitro*

A linhagem celular de melanoma humano SK-MEL-28, é proveniente de um melanoma cutâneo de pele, de sítio primário, de um homem, 51 anos, caucasiano. Possui mutações como, BRAF, MAPK1, TP53. Além disso, pertence a uma série extensa de linhagem de melanoma. São células de adesão e possuem morfologia poligonal. É considerada uma linhagem celular adequada para realização de transfecção celular (ATCC, 2024).

5.2 Cultivo celular

A linhagem celular de melanoma humano SK-MEL-28 (ATCC® HTB-72™), proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA), foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Patrícia Possik, do grupo de Biologia Funcional de Tumores do INCA-RJ. As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A) e 0,5 % de antibiótico-antimicótico (Anti-anti) (Gibco-Thermo-Fisher, Waltham, MA, USA). Foram mantidas em estufa de atmosfera úmida com 5% de CO₂ a temperatura de 37°C no Laboratório do Comportamento Celular (LCC). Foi feita a expansão e o

congelamento do estoque de celular. Para realização dos experimentos as células foram utilizadas quando apresentavam 70-80% de confluência.

5.3 Descongelamento e expansão das linhagens celulares

Para expansão e realização dos experimentos, alíquotas das linhagens celulares previamente congeladas e armazenadas a -80°C foram descongeladas, transferidas para tubo Falcon com 5 mL de meio DMEM e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, em seguida procedeu-se com o descarte do sobrenadante, ressuspensão com 10 mL de meio completo e transferência para placa de 100 mm, mantidas em estufa nas condições já descritas. Durante esta fase de expansão o crescimento das células foi acompanhado diariamente, com troca do meio a cada 24 horas.

Após as células atingirem uma confluência de 70-80%, o meio foi retirado, e a monocamada de células foi lavada com PBS 1X estéril. Após a lavagem das células foi adicionado tripsina a 0,25% (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) seguida de incubação por 2 minutos em estufa a 37°C , para o destacamento da monocamada de células aderidas à placa. Após a tripsinização, com o objetivo de inativar a tripsina, foi adicionado o dobro de meio contendo SFB. Para contagem e plaqueamento das células, as mesmas foram centrifugadas em temperatura ambiente por 5 minutos a 1000 rpm e ressuspensas em 2 mL de DMEM completo (com 10% de SBF) e retirada uma alíquota de 50 μL para a contagem manual, utilizando a Câmara de Neubauer. Após a contagem das células, a quantidade de células que foram semeadas na placa foi dependente da placa utilizada, sendo 5×10^3 em placa de 96 poços e $5,5 \times 10^4$ em placa de 24 poços.

5.4 Vetor de expressão SOX3

O vetor de expressão da proteína SOX3 em sistema de mamíferos foi produzido no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Akron EUA, e são mantidos em banco de vetores para a família SOX3 na Universidade de Walsh, em North Canton em Ohio, e foram gentilmente doados pelo pesquisador Dr. Adam Underwood. A amostra de DNA utilizada para amplificação do gene SOX3 foi adquirida da empresa Thermo, com o número de catálogo: MHS627846-202857278 (California – EUA), e os primers para sua amplificação, a temperatura de anelamento utilizada na reação de PCR e as enzimas de digestão utilizadas para a digestão do fragmento estão listados na Tabela 2.

Tabela 1 - Primer para clonagem e condições de anelamento para SOX3.

SOX gene	Sequência dos primers	T(a) °C	Enzimas de restrição para clonagem	pEF1-vector frame
SOX3 Right Primer	AAAG <u>GAATTCT</u> CCGATGTGGGTC AGCGGCA	59.8	BamHI e EcoRI	A
SOX3 Left Primer	ATAG <u>GGATCC</u> GGAATGCGACCTG TTCGAGAGA	59.8	BamHI e EcoRI	A

Fonte do DNA genômico para amplificação do gene SOX3: Thermo: MHS6278202857278 – California – EUA

O vetor utilizado para ligação, transformação bacteriana e posterior purificação para a transfecção celular foi o pEF1/MycHis (Figura 1), e o gene foi clonado no vetor utilizando-se a janela de leitura A (Tabela 2).

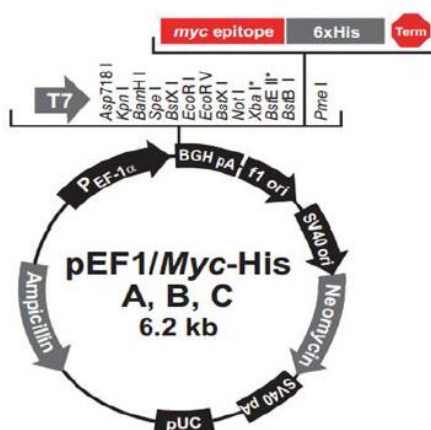


Figura 5 - Vetor de expressão pEF1/Myc-His utilizado para clonagem de SOX3.

Fonte: Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pef1mychis_man.pdf

5.5 Transfecção das células SK-MEL-28 com o vetor pEF1/Myc-His/SOX3 e vetor vazio pEF1/Myc-His

Após 24 horas do plaqueamento, e com uma confluência de 70 % as células foram divididas em três grupos distintos: grupo controle, representado por células selvagens sem transfecção (CTR), grupo controle transfectadas com vetor vazio pEF1/MycHis (CV) e grupo transfectadas com pEF1/MycHis/SOX3 (SOX3). Para a transfecção, foi utilizado o kit de transfecção LipofectamineTM 3000 Transfection Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

A preparação dos reagentes para a transfecção foi realizada seguindo as etapas: 1) diluição de Lipofectamine® em tubo contendo meio OPTI- MEM™ (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, Nova York); 2) em outro tubo foi adicionado 25 µL de meio OPTI- MEM™, Reagent *plus* P3000®, e de DNA plasmidial; 3) após 15 min as soluções dos dois tubos foram unificadas e reencubadas por mais 15min. As quantidades de reagente e DNA plasmidial estão descritas na tabela 3.

Após esse tempo, o meio foi removido das placas, e a monocamada de células foi lavada com PBS 1X estéril, e após essa lavagem foi adicionado o mix de transfecção em cada poço, completando o volume do poço de 400 µL com meio OPTI-MEM™ sem SFB. Após 4 horas de incubação, os poços foram suplementados com 10% de SFB. As células foram incubadas por 24 horas, após esse período, as células foram utilizadas em protocolos de imunofluorescência, viabilidade pelo método de MTT, avaliação da expressão de genes da TEM e ensaio de migração celular.

Tabela 2 - Quantidade utilizada de cada reagente do kit Lipofectamine® para transfecção de acordo com o número de poços de cada placa.

Poços	Lipofectamine	P3000	DNA plasmidial	OPTI-MEM™
96 poços	0,3 µL p/ poço	0,4 µL p/ poço	200 ng	20 µL
24 poços	1 µL p/poço	1 µL p/poço	500 ng	25 µL

5.6 Imunofluorescência em células transfectadas

A imunofluorescência foi realizada para confirmar a superexpressão e localização da proteína SOX3, assim como para avaliar a expressão e localização das proteínas E-caderina e N-caderina, após o protocolo de transfecção.

Antes de realizar o plaqueamento das células, as lamínulas de vidro de 13 mm passaram por um processo de lavagem e esterilização. As lamínulas foram colocadas em solução de água com sabão neutro e deixadas de molho *overnight*. Após o molho as mesmas foram enxaguadas em água corrente, retirando todo o sabão e possíveis sujidades. Foi preparado uma solução contendo 50% de álcool etílico e 50% de éter e novamente as lamínulas foram deixadas de molho *overnight*. No dia seguinte as lamínulas foram secas uma por uma, utilizando lenço de papel macio. Ao serem secas as lamínulas foram colocadas em uma placa de petri com o fundo forrado com papel manteiga. A esterilização

das lamínulas foi realizada em micro-ondas na potência 30W, durante 3 minutos com a tampa da placa aberta e novamente por 3 minutos com a tampa da placa fechada.

As lamínulas estéreis foram colocadas nos poços da placa de 24 poços, dentro da capela de fluxo laminar. Em seguida as células foram semeadas sobre as lamínulas, desta forma as células aderiram e cresceram na superfície das lamínulas. Após 24 horas de incubação, as células passaram pelo protocolo de transfecção descrito no item 5.5.

Após 24 horas da transfecção, foi iniciado o protocolo de imunofluorescência. Foi retirado o meio dos poços e eles foram lavados com PBS. As células foram fixadas em solução de formalina a 4% em PBS e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação com a formalina os poços foram lavados 3 vezes com PBS. Em seguida as células foram permeabilizadas com solução de triton 0,1% em PBS, e incubadas em temperatura ambiente por 3 minutos e lavadas novamente por 3 vezes com PBS. Após a permeabilização, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de BSA a 2% em PBS e incubados por 30 minutos, e ao término do bloqueio os poços foram lavados 3 vezes com PBS por 5 minutos. O anticorpo primário anti-Goat SOX3 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), anticorpo primário anti-mouse E-cadherin (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e anticorpo primário anti-mouse N-cadherin (Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA) foram diluídos em PBS/BSA 2% na concentração de 5 µg/mL, 1:200 e 1:50 respectivamente. Para a marcação de SOX3 as lamínulas foram retiradas da placa e colocadas em contato com 30 µL do anticorpo e incubadas por 4 horas em câmara úmida. Após o tempo de incubação com o anticorpo primário, as lamínulas foram colocadas novamente nos poços e foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos, quando houve dupla marcação de SOX3 com E-cadherin ou N-cadherin as lamínulas foram incubadas *overnight*. Após o tempo de incubação as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS. As lamínulas foram novamente retiradas dos poços e foram incubadas por 1 hora com 30 µL do anticorpo secundário Donkey anti-Goat Alexa Fluor 568 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), diluído em PBS/BSA 2% na concentração de 8 µg/mL. Após o tempo de incubação as lamínulas foram colocadas na placa e lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos. As lamínulas foram novamente retiradas dos poços e foram incubadas por 1 hora com 30 µL do anticorpo secundário Goat anti-Mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), diluído em PBS/BSA 2% na concentração de 8 µg/mL. Após o tempo de incubação as lamínulas foram colocadas na placa e lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos. Em seguida as lamínulas foram incubadas por 1 minuto em 30 µL de

solução de DAPI (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), diluído em PBS na concentração de 1 µg/mL. Os processos de incubação com o anticorpo e com o DAPI foram realizados protegendo as lamínulas da luz. Novamente as lamínulas foram colocadas na placa e lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos. Após o último processo de lavagem, as células foram montadas em lâmina utilizando Hydromount (National Diagnostics, Geórgia, EUA) e foram observadas em microscópio de fluorescência. O método foi realizado em triplicata.

5.7 Quantificação da fluorescência

Para a imunolocalização e quantificação da expressão da proteína SOX3, foram capturadas 15 imagens representativas de cada grupo no microscópio de fluorescência, num aumento de 400x, através do ZEN Software (ZEISS ZEN core, Carl Zeiss Microscopy, Germany). A Intensidade de Fluorescência foi definida com base no grupo controle e utilizada para a captura de todos os grupos, a fim de garantir o mesmo tempo de exposição para todas as condições. Para mensuração da quantidade de fluorescência por foto foi utilizado o software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) e a seguinte fórmula para retirada de background das imagens:

$$\text{Fluorescence intensity} = \text{Integrated} - (\text{Total area} \times \text{Mean value background})$$

A quantificação da expressão de SOX3 foi baseada na intensidade de fluorescência emitida nas fotos capturadas dos grupos avaliados. As imagens foram avaliadas em 8 bit.

5.8 Avaliação da viabilidade celular através do método MTT

Para avaliar a citotoxicidade do protocolo de transfecção com o vetor de expressão para a proteína SOX3 foi realizado o ensaio com MTT (3-(4,5-dimethylthi-azol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Após o período de 24 horas da transfecção, utilizando uma bomba de vácuo foi retirado o sobrenadante da placa e adicionada 100 µL de solução de MTT (SigmaAldrich, EUA) na concentração 0,25 mg/mL, diluído em meio DMEM. A placa foi incubada novamente por 4 horas, ao abrigo da luz. Após incubação, o sobrenadante foi retirado e

adicionou-se 100µL de Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo BR) em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan. Foi feita a leitura da absorbância em aparelho leitor de microplacas (SpectraMax 190 absorbance microplate reader, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA.) num comprimento de 570 nm. Com a obtenção dos valores de absorbância foi realizada a correção com a diminuição do valor da leitura do branco e determinação do percentual de viabilidade celular, sendo o valor do controle dado como 100%. Foi realizada a amostragem em triplicata, em três experimentos independentes.

5.9 Extração de RNA total com o vetor de expressão para SOX3

Para avaliar a expressão gênica de SOX3, CDH1 (E-cad), CDH2 (N-cad), Snail e dos normalizadores GAPDH e RPS28 realizou-se a extração de RNA total das células SK-MEL-28. Após 24 horas da transfecção em placa de 24 poços, o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. Em cada poço foi colocado 300µL de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após a ação do Trizol, a solução foi retirada dos poços e colocada em microtubos de 2 mL, contendo o pellet obtido da centrifugação do sobrenadante. A extração do RNA total foi feita de acordo com o protocolo do fabricante, sem modificações. Ao final da extração de RNA o pellet foi ressuspendido em 50µL de água estéril livre de DNase e RNase, e as amostras foram quantificadas utilizando Nanodrop (NanoDrop Lite Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA).

5.10 Transcrição reversa e PCR convencional

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) sem modificações e seguido as recomendações do fabricante, em um volume final de reação de 20 µL. O mix foi submetido à incubação de 10 minutos a 25 °C, seguido de 2 horas a 37 °C e por fim 5 minutos a 85 °C no termociclador MiniAmp™ Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA).

As reações de PCR convencional foram realizadas em termociclador modelo MiniAmp™ Plus Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA) nos seguintes ciclos: Estágio 1: Desnaturação Inicial: 1 ciclo de 94°C/1 min.

Estágio 2: Desnaturação, Anelamento e Extensão: 40 ciclos de 94°C/15 seg., 57°C/15 seg., 72°C/15 seg. Estágio 3: Extensão Final: 1 ciclo de 92°C/5 min. Os primers utilizados nas reações encontram-se na tabela 4.

Tabela 3 - Primers utilizados na reação de PCR. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica dos genes alvos.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	GenBank Accession number
GAPDH	TGGGTGTGAACCATGA GAAG	GAGTCCTTCCACGATAC CAAAG	NM_001289746 .1
SOX3	GTTGGGACGCCTTGTT TA	TCGCTGCTCCTGACTTA T	NM_005634.2

5.11 Eletroforese após a RT-PCR

Os produtos da RT-PCR convencional foram identificados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Para isso, utilizou-se 10,5 mL de água MilliQ, 4 mL de tampão TBE 5%, 5,33 mL de solução estoque de acrilamida 30%, 200 µL de persulfato de amônio 10% (PA) e 18 µL de TEMED. Anteriormente a corrida, foi adicionado em cada amostra 10 µL de tampão de corrida Gel Loading Buffer (GLB). Foram pipetados no gel 5 µL de marcador 100pb DNA e 10 µL de cada amostra contendo GLB. Após pipetado o marcador e as amostras, a corrida ocorreu em equipamento de eletroforese em tampão TBE 1X por cerca de 50 minutos a 110 volts. Ao finalizar a corrida o gel foi fixado por 10 minutos em solução de etanol (10%), ácido acético (0,5%) e 89,5 mL de água MilliQ. A solução fixadora foi reservada e em seguida foi realizada a impregnação em nitrato de prata (0,1%) por 10 minutos ao abrigo da luz. Após o nitrato de prata o gel foi lavado com água MilliQ e foi adicionada solução reveladora contendo: 3 g de hidróxido de sódio (3,6%), 300 µL formol (0,3%) em um volume final de 100 mL de água MilliQ. Após o aparecimento das bandas, foi retirada a solução reveladora, lavado o excesso com água destilada e o gel foi fotografado.

5.12 Transcrição reversa e PCR em tempo real

A transcrição reversa e síntese do cDNA seguiu o mesmo protocolo descrito no item 5.10. As amostras de cDNA resultantes da Transcrição Reversa (RT) foram

submetidas à PCR em tempo real utilizando o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e os primers descritos na tabela 5. As amostras (20 ng de cDNA) foram aplicadas em placas de 96 poços ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicata, com o volume final de 20 µL.

As reações da PCR em tempo real, foram realizadas em termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA), seguindo o ciclo termal: estágio 1) um ciclo de 50 °C/2 minutos; estágio 2) um ciclo de 95 °C/10 minutos; estágio 3) 40 ciclos de 95 °C/15 segundos e 60 °C/1 minuto, estágio 4) um ciclo de 95 °C/15 segundos e pôr fim a realização da curva de Melting a 60 °C/1 minuto, para determinação da especificidade dos fragmentos amplificados.

Tabela 4 - Primers utilizados na RT-qPCR. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica dos genes alvos.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	GenBank Accession number
RPS28	GCAGAATCCACGCCAGTAC AAG	GCTTGTGTGCCAGACC ATTGGC	NM_022551
CDH1 (Ecad)	GCCTCCTGAAAAGAGAGT GGAAG	TGGCAGTGTCTCTCCA AATCCG	NM_004360
CDH2 (NCad)	CCTCCAGAGTTTACTGCCA TGAC	GTAGGATCTCCGCCAC TGATTC	NM_001792
SNAIL1	TGCCCTCAAGATGCACATC CGA	GGGACAGGAGAAGG GCTTCTC	NM_005985

5.13 Análise da PCR em tempo real

Os dados da PCR em tempo real foram acessados pelo método CT comparativo ($[CT \text{ médio do gene alvo}] - [CT \text{ médio do controle endógeno}]$), o controle endógeno S18 foi usado para normalizar o gene alvo e gerar o ΔCT . O $\Delta\Delta CT$ ($[\Delta CT \text{ amostra}] - [\Delta CT \text{ do controle}]$) foi calculado, e o $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi aplicado para obter os níveis de expressão relativa de cada gene alvo (Schmittgen, Livak, 2001).

5.14 Ensaio de migração celular

Para avaliar os efeitos da transfecção com o vetor de expressão para SOX3 sobre os efeitos migratórios das células, foi realizado o ensaio de cicatrização de feridas utilizando um sistema Ibidi Culture-Insert 2 Well (Ibidi, Martinsried, Germany), um inserto de silicone que permite a divisão do poço em dois compartimentos para criar um campo pseudo-ferida livre de células com uma largura definida (500 μm). Para isso, o inserto foi posicionado em poços de uma placa de 24 poços em que foram semeadas células SK-MEL-28, sendo $1,25 \times 10^4$ células por compartimento utilizando DMEM suplementado com 10% SFB. Após 24h, as células foram transfectadas segundo o protocolo já descrito, após 4h o meio foi retirado e foi lavado com PBS para remover detritos celulares, a placa foi incubada novamente com meio DMEM, contendo 0,5% de anti-anti e 10ug/ml de mitomicina. Dois pontos da área da ferida foram fotografados no tempo 0h, 12h, 24h e 36h. O percentual de fechamento da ferida foi calculado de acordo com a fórmula abaixo adaptada de Rotzer e colaboradores (Rötzer *et al.*, 2016). Onde a ferida foi determinada medindo a porcentagem de área livre de células restante em comparação com a área de ferida inicial, para isso foi utilizado o programa Image J (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

$$\text{Fechamento da ferida}(\%) = \left[\frac{A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} \right] \times 100$$

$A_{t=0h}$: área da ferida em $t=0h$

$A_{t=\Delta h}$: área da ferida no tempo de interesse

5.15 Estatística

Os dados estatísticos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os resultados quantitativos foram comparados por meio dos testes one-way ANOVA, one-sample T e seus equivalentes a depender da normalidade dos dados, e avaliados a diferença entre grupos por meio do pós-teste de Tukey ou o de Dunn. Os resultados considerados estatisticamente significativos são aqueles que apresentam $P \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da expressão gênica de SOX3 na linhagem SK-MEL-28

Para avaliação da presença da expressão gênica de SOX3 na linhagem celular SK-MEL-28, foi realizada RT-PCR convencional. Na análise do gel observou-se que as amostras foram positivas para GAPDH, mostrando a integridade das amostras após os processos de extração e RT-PCR. Em contrapartida, não foi observada a expressão de mRNA para SOX3 na linhagem SK-MEL-28 (Figura 2).

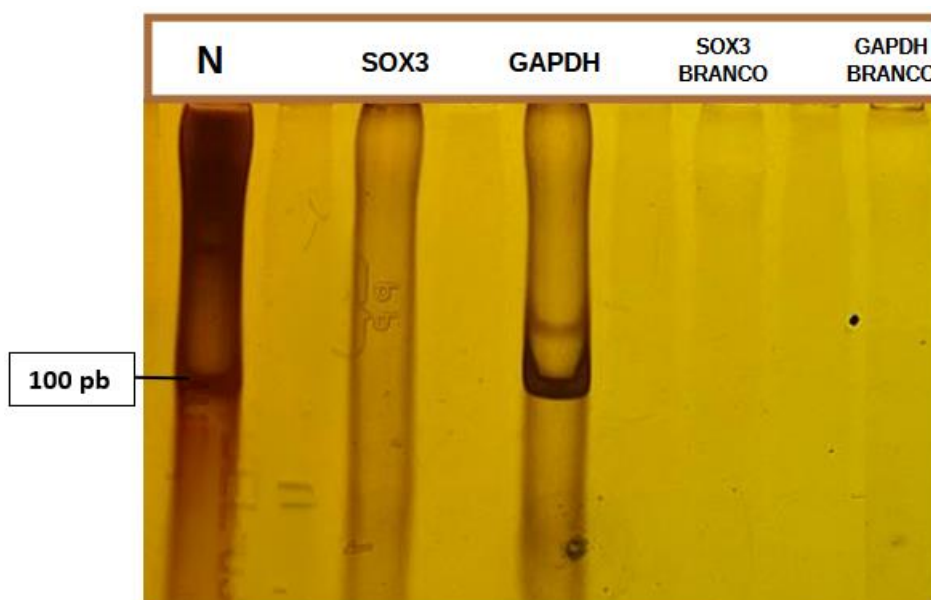


Figura 6 - Expressão de SOX3 na linhagem SK-MEL-28. N marcador 100pb de DNA; **SOX3** (126pb) ausência de amplificação; **GAPDH** (125pb) gene de referência; **SOX3 Branco e GAPDH Branco** controles negativo da reação de PCR, com ausência do template. Gel de poliacrilamida mostrando resultado da PCR convencional. 10 μ L do resultado da PCR convencional foi pipetado no gel e visualizado por impregnação com nitrato de prata após eletroforese a 100V/50 minutos.

6.2 Imunofluorescência para SOX3 em células SK-MEL-28 transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3

O protocolo de imunofluorescência foi realizado em todos os grupos experimentais, incluindo o grupo controle, onde não há a presença de nenhum DNA plasmidial adicional, para validação da transfecção e expressão de SOX3.

A expressão nuclear da proteína SOX3 foi nas células SK-MEL-28 transfectadas (Figura 3C). Em contraste, as células controle e as células transfectadas com o vetor vazio pEF1, não foi observada a presença nuclear de SOX3, mas houve uma baixa detecção de fluorescência citoplasmática (Figura 3A e 3B).

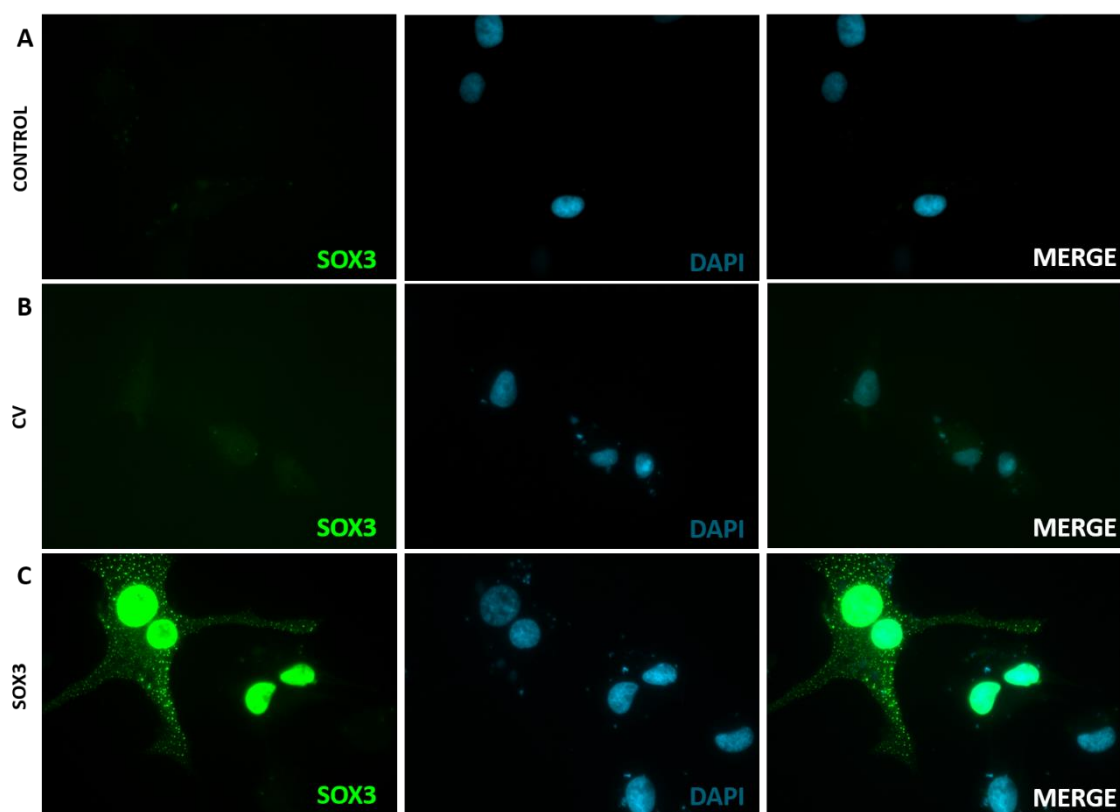


Figura 7 - Expressão de SOX3 avaliada por imunofluorescência na linhagem SK-MEL-28 após transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Células sem transfecção; B - Células transfectadas com o pEF1-vetor vazio; C - Células transfectadas com pEF1-SOX3. Fotomicrografias evidenciando a marcação nuclear para 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcação nuclear e citoplasma para SOX3 (FITC), e sobreposição das imagens (MERGE). As imagens foram adquiridas com auxílio de microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axio Vert.A1 no aumento de 400x.

Com base na fluorescência emitida pela proteína expressa e imunomarcada nas células com o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (FITC) foi feito o cálculo de Intensidade de fluorescência por cada grupo experimental.

Foi observado que após análise da intensidade de fluorescência, ficou evidente que nas células transfectadas com pEF1-SOX3, teve um aumento significativo na intensidade de fluorescência, quando comparada com os demais grupos, confirmando que o protocolo de transfecção utilizado era capaz de produzir uma expressão proteica de SOX3 nas células (Figura 4).

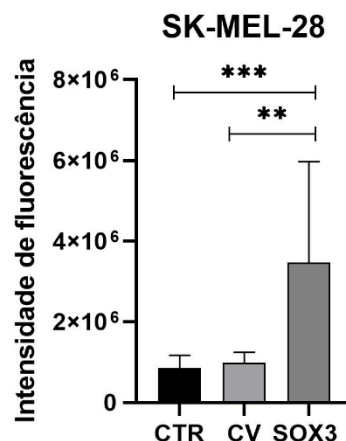


Figura 8 - Intensidade de fluorescência da imunomarcção para SOX3 em linhagem SK-MEL-28 após transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. CTR = controle células sem transfecção; CV - transfectado com o vetor vazio pEF1; SOX3 - transfectado com o vetor de expressão para SOX3. Quantificação da intensidade de fluorescência de SOX3 imunomarcada em células transfectadas para supexpressão de SOX3 e seus grupos controles. Resultado considerando Média ± DP, onde *** $p < 0,0004$ SOX3 em relação ao grupo CTR, e ** $p < 0,0060$ SOX3 em relação ao grupo CV.

6.3 Viabilidade celular em células transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3

Por meio do ensaio de MTT, avaliou-se a viabilidade das células transfectadas. Considerando a quantificação do cristal de formazan produzido pelas células do grupo controle (ausência de adição de qualquer DNA) como 100% de viabilidade, observou-se nas células SK-MEL-28 foi observado uma viabilidade de 92% quando transfectadas com pEF1/MycHis/SOX3 e 61% quando transfectadas com pEF1/MycHis. Contudo, foi possível observar que a transfecção e, conseqüentemente, a maior expressão de SOX3 na linhagem SK-MEL-28, preservou a viabilidade celular (Figura 5). Assim, como podemos observar nas imagens adquiridas em microscópio invertido de fundo claro (Figura 6).

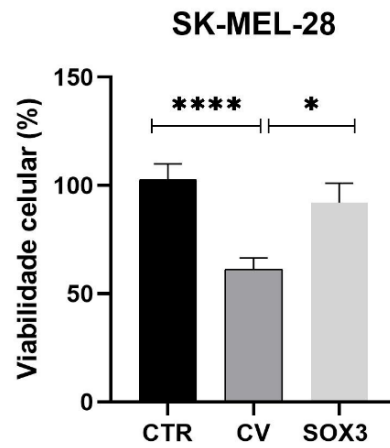


Figura 9 - Viabilidade células das células SK-MEL-28 transfetadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. CTR – células sem transfecção; CV - transfetado com o vetor vazio pEF1; SOX3 - transfetado com o vetor de expressão para SOX3. Percentuais de viabilidade celular, inferido a partir do método de MTT, na linhagem celular SK-MEL-28 transfetadas com o vetor para expressão de SOX3. Resultado considerando Média \pm DP, onde ** p <0,0001 CV em comparação com CTR, e * p <0,0189 SOX3 em comparação com CV.**

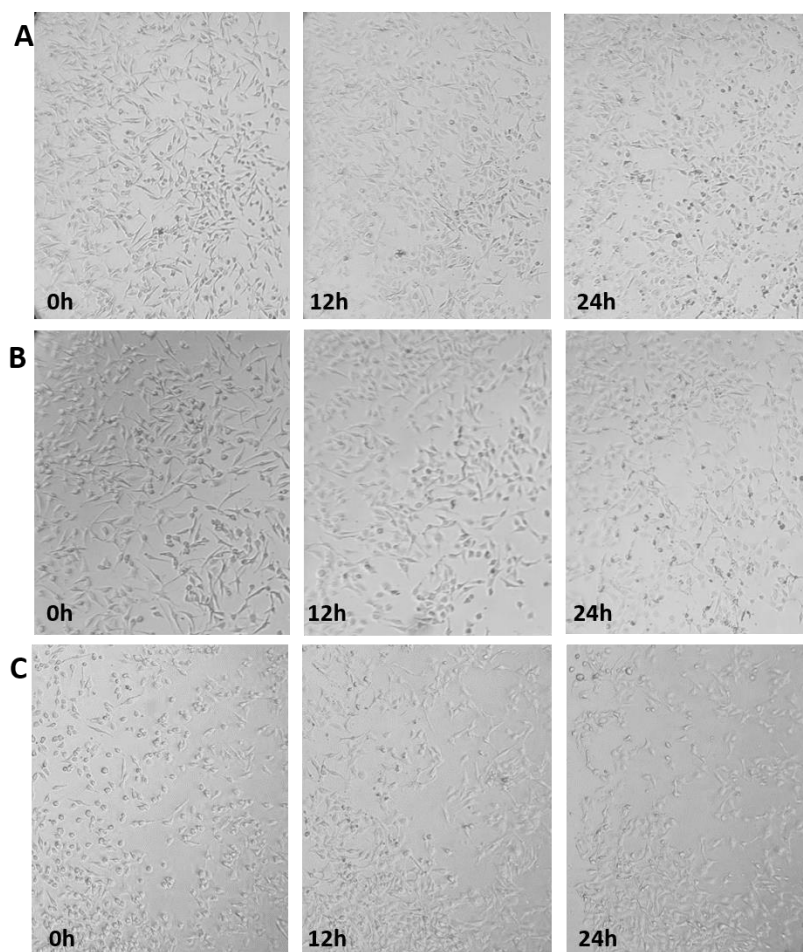


Figura 10 - Fotomicrografia das células SK-MEL-28, capturada antes e após a transfeção transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Células sem transfeção; B - Células transfectadas com o pEF1-vetor vazio; C - Células transfectadas com pEF1-SOX3. Ilustrando a viabilidade celular inalterada. Na imagem A observa-se o aumento da confluência, na imagem B observamos que após 24 de transfeção apresenta maior presença de debris celular e algumas células não aderidas, enquanto na imagem C observamos que após 24h de transfeção, além do aumento da confluência podemos ver a mudança da morfologia celular em comparação com 0h. Aumento de 5x, microscópio invertido (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany).

6.4 Avaliação por PCR em tempo real da expressão de genes relacionados a TEM após a transfeção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3

Após a transfeção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis, foi realizada a PCR em tempo real para a quantificação relativa de genes relacionados a TEM, sendo CDH1/E-cad relacionado a células com perfil epitelial e CDH2/N-cad e Snail relacionados a células com o perfil mesenquimal.

Foi possível observar uma redução na expressão de mRNA de E-caderina (redução de 1,23 vezes), N-caderina (redução de 2,56 vezes) e um aumento na expressão de Snail (aumento de 1,60 vezes) nas células transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 (Figura 7), quando comparado às células transfectadas com vetor vazio pEF1/MycHis.

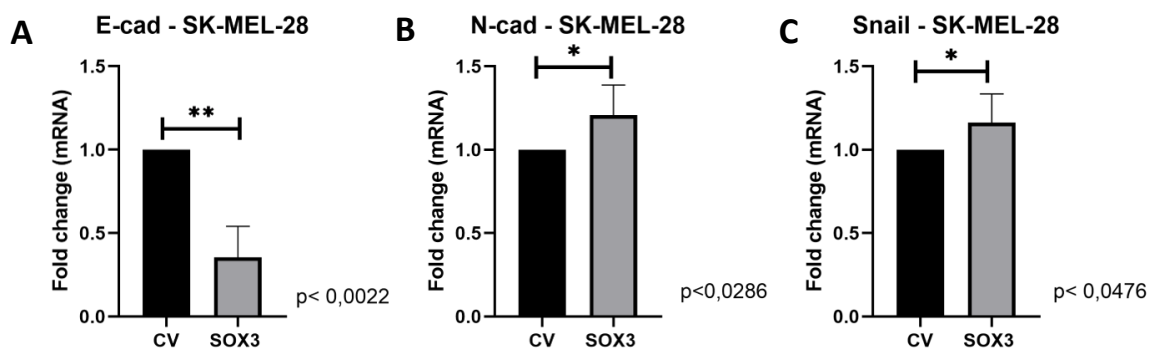


Figura 11 - Avaliação da expressão de genes associados a TEM na linhagem SK-MEL-28 após a transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Expressão de E-caderina, B - Expressão de N-caderina; C - Expressão de Snail. sendo CV transfectado com o vetor vazio pEF1; SOX3; transfectado com o vetor de expressão para SOX3; A qPCR em tempo real foi expressa como ΔCT , que é o limiar do ciclo (Ct) do gene alvo menos o gene de referência, S18. A expressão gênica relativa foi calculada usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT$ do grupo transfectado menos o ΔCT do grupo controle. Os resultados de PCR em tempo real demonstraram menor expressão de mRNA de E-cad e N-cad e maior expressão de mRNA de Snail, comparando o grupo controle com o transfectado, sendo significativo p < 0,05.

6.5 Imunofluorescência para E-caderina e N-caderina em células SK-MEL-28 transfectadas com o vetor pEF1/MycHis/SOX3

O protocolo de imunofluorescência foi realizado em todos os grupos experimentais, para identificação de E-caderina e N-caderina nas células, após a transfecção para o vetor de expressão de SOX3 (Figura 8 e 9).

Foi possível observar, a marcação citoplasmática e membranar de E-caderina nas células sem transfecção e transfectadas com vetor vazio pEF1 (Figura 8 A e B). Em contraste, nas células transfectadas com SOX3, observou-se baixa detecção de fluorescência (Figura 8C).

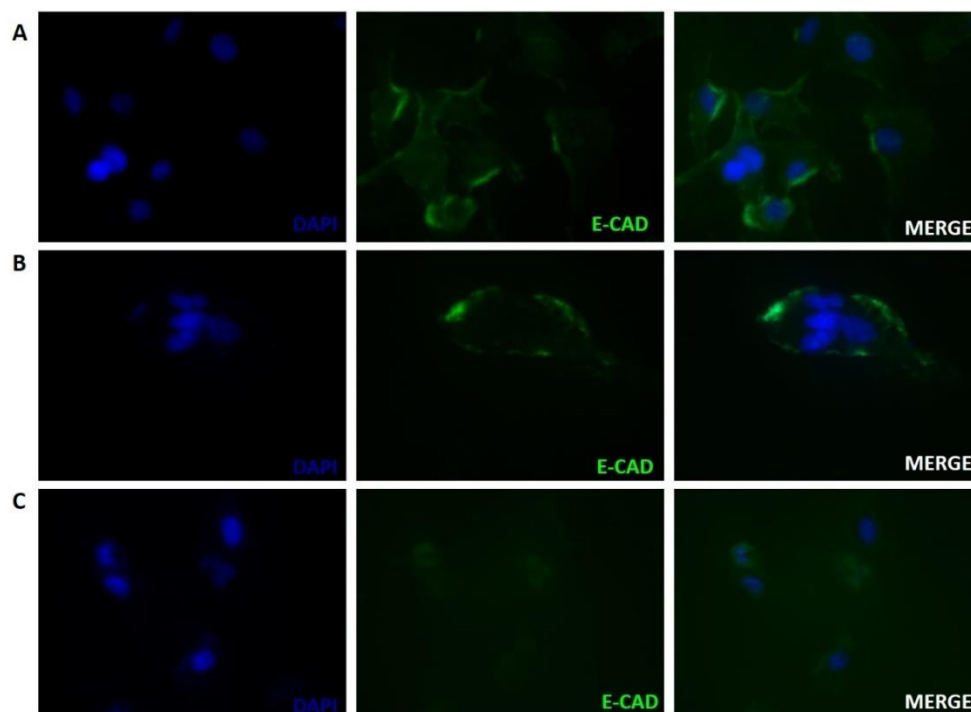


Figura 12 - Expressão de e-caderina avaliada por imunofluorescência na linhagem SK-MEL-28 após transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Células sem transfecção; B - Células transfectadas com o pEF1-vetor vazio; C - Células transfectadas com pEF1-SOX3. Fotomicrografias evidenciando a marcação nuclear para 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcação nuclear e citoplasma para e-cad (FITC), e sobreposição das imagens (MERGE). As imagens foram adquiridas com auxílio de microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axio Vert.A1 no aumento de 400x.

Em adição, na marcação de N-caderina, foi possível observar expressão citoplasmática nas células sem transfecção e transfectadas com vetor vazio pEF1 (Figura 9 A e B). Em contraste, nas células transfectadas com SOX3 houve baixa detecção de fluorescência, com presença de marcação nuclear (Figura 9C).

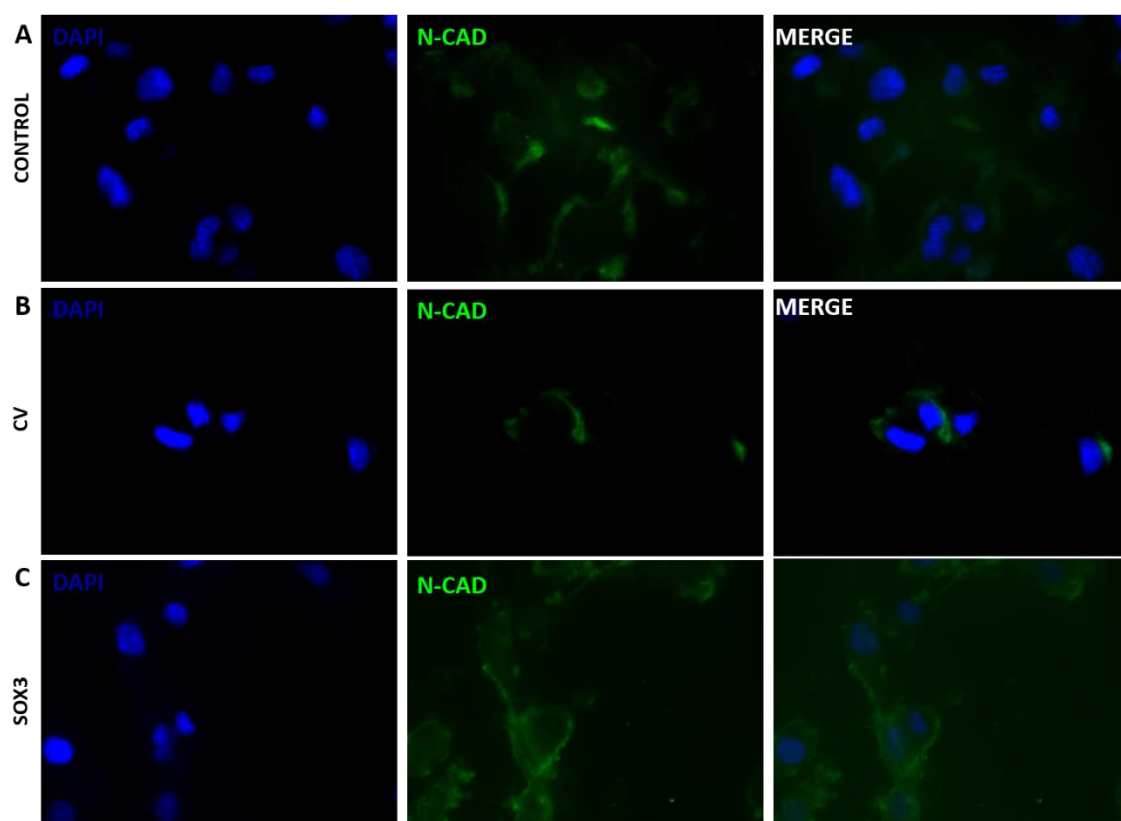


Figura 13 - Expressão de n-caderina avaliada por imunofluorescência na linhagem SK-MEL-28 após transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. A - Células sem transfecção; B - Células transfectadas com o pEF1-vetor vazio; C - Células transfectadas com pEF1/MycHis. Fotomicrografias evidenciando a marcação nuclear para 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcação nuclear e citoplasma para n-cad (FITC), e sobreposição das imagens (MERGE). As imagens foram adquiridas com auxílio de microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axio Vert.A1 no aumento de 400x.

6.6 Avaliação da migração celular após a transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis

Por meio do ensaio de migração, foi possível quantificar a porcentagem de preenchimento do meio, por células, após a transfecção com o vetor de expressão para SOX3 (Figura 10).

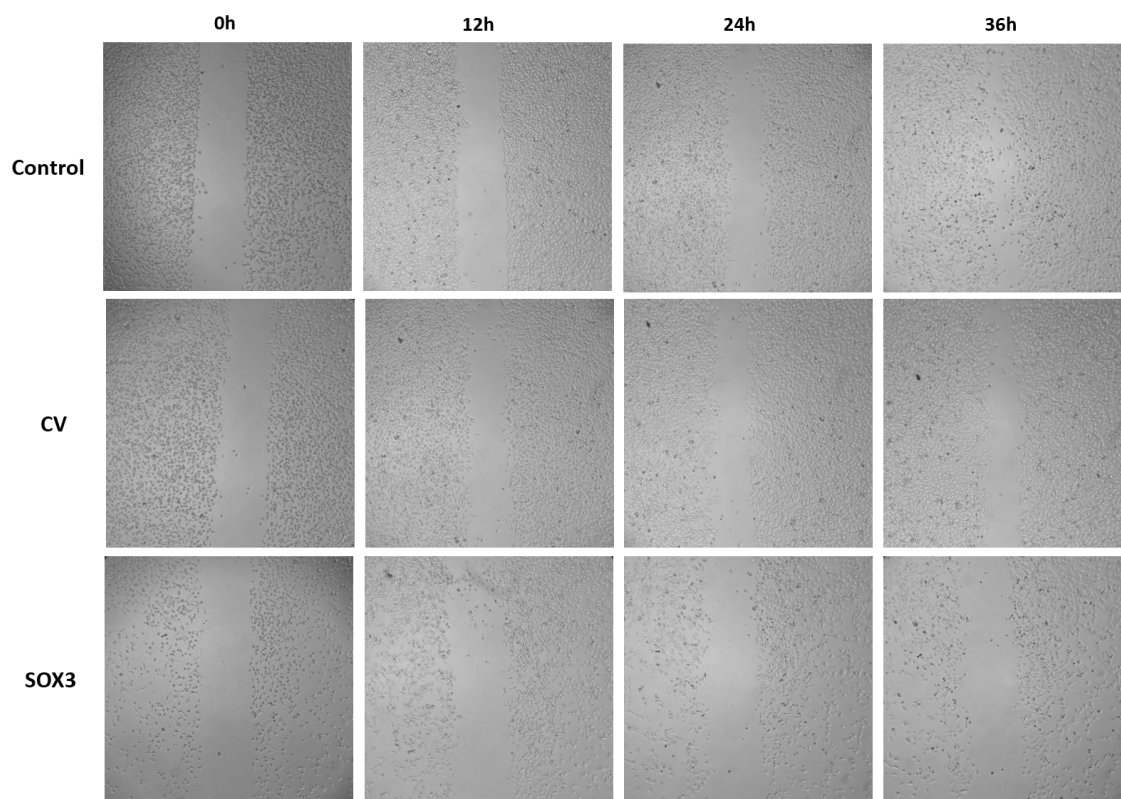


Figura 14 - Fotomicrografia do ensaio de migração celular utilizando as célula SK-MEL-28 após transfecção com o vetor pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. Pode-se observar o fechamento da ferida nos tempos 0h, 12h, 24h e 36h, para diferentes grupos celulares: sem transfecção (Control), transfectado com o vetor vazio (CV) e transfectado com vetor de expressão para SOX3 (SOX3). Ampliação de 5x, microscópio invertido (Wilovert Standard HF 20 – Hund Wetzlar, Wetzlar, Germany).

Foi realizado o cálculo de fechamento da ferida em porcentagem dos tempos 12, 24 e 36h após a transfecção. Foi possível observar uma menor área de preenchimento da ferida em células SK-MEL-28 transfectadas com vetor de expressão para SOX3, em todos os tempos avaliados (Figura 11).

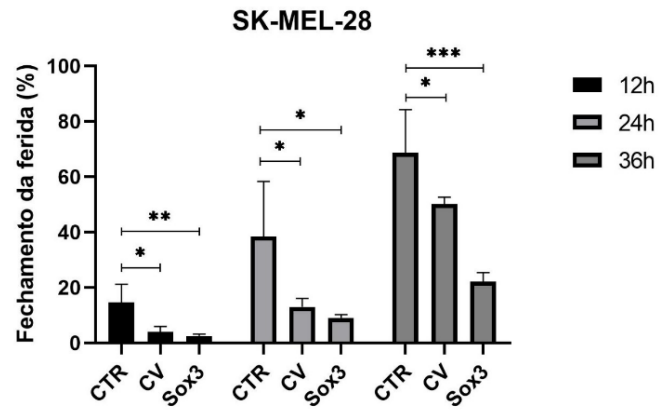


Figura 15 - Avaliação da migração celular após transfeccção das células SK-MEL-28 com o pEF1/MycHis/SOX3 e vetor vazio pEF1/MycHis. CTR - sem transfeccção; CV - transfectado com o vetor vazio pEF1; SOX3 - transfectado com o vetor de expressão para SOX3. Percentual de fechamento da ferida após 12, 24 e 36h da transfeccção celular sendo significativo $p < 0,05$.

7 DISCUSSÃO

As descobertas deste estudo fornecem informações valiosas sobre o papel do SOX3 no processo de transição epitélio-mesênquima em células de melanoma humano. A análise da expressão gênica avaliada por qPCR demonstraram que o principal marcador epitelial E-caderina, teve uma regulação negativa, enquanto o principal marcador mesenquimal N-caderina, teve uma regulação positiva e o fator de transcrição envolvido na alteração de epitelial para mesenquimal Snail, também houve uma regulação positiva. Além disso, foi visto que as células transfectadas com o vetor de expressão para SOX3 reduzem a migração celular, sugerindo um papel da SOX3 na regulação da invasão. A natureza invasiva do melanoma, caracterizada pela sua progressão, sublinha a necessidade de explorar novos fatores que contribuem para o seu potencial metastático (Shibue; Weinberg, 2017).

TEM é um evento crítico na progressão de tumores invasivos como o melanoma (Shibue; Weinberg, 2017). Este processo envolve alterações fenotípicas nas células, resultando na perda das junções célula-célula e da polaridade apical-basal, aumentando suas capacidades migratórias e invasivas. Embora a TEM esteja tradicionalmente associada a células epiteliais, também foi observada em tumores neuroectodérmicos, incluindo melanoma (Tang *et al.*, 2020). A TEM é crucial na diferenciação dos melanócitos, aumentando o potencial metastático e a resistência aos medicamentos (Ma *et al.*, 2023). Além disso, é observado a perda da expressão de genes como E-caderina e a expressão de fatores de transcrição como Snail1 em melanomas, que reprimem a expressão de E-caderina, promovendo a diferenciação celular (Pedri *et al.*, 2022). Esses dados corroboram com o que observamos em nosso trabalho, onde a expressão de Snail aumentou e E-cad diminuiu após o aumento de expressão de SOX3, em células transfectadas.

A expressão e função de diferentes membros da família SOX já foram descritas em melanomas, como por exemplo SOX9 e SOX10. Sendo que, SOX10 promove o início e a progressão do melanoma. Enquanto SOX9, resulta na parada do ciclo celular e indução da apoptose em células de melanoma (Shakhova *et al.*, 2015). SOX3 tem sido implicado em vários tumores e associado ao aumento de malignidade (Castillo; Sanchez-Cespedes, 2012; Grimm *et al.*, 2020). Mas a expressão e função de SOX3 no melanoma ainda não foi elucidado.

No presente estudo, a expressão de SOX3 foi avaliada na linhagem tumoral SK-MEL-28. Não se tem registros em banco de dados que informem se possui ou não a expressão de SOX3 (The Human Protein Atlas, 2023). Neste estudo, foi observado que não se tem a expressão gênica e proteica para SOX3, em células SK-MEL-28, tanto na análise de RT-PCR quanto na imunofluorescência. Outros estudos que realizaram a transfecção de SOX3 em outras linhagens celulares, como T98 e A172 de glioblastoma (Vicentic *et al.*, 2018), MDA-MB-231 de mama (Silva *et al.*, 2022), foram vistos, que antes da transfecção as linhagens também apresentaram uma expressão basal mais baixa ou não expressavam SOX3 nas células.

A transfecção e o aumento de SOX3, não teve impacto significativo na viabilidade celular quando comparada com as células controle, mas quando comparado com as células que foram transfectadas com o vetor vazio foi possível observar um aumento da viabilidade das células transfectadas com SOX3. A avaliação de proliferação e morte celular devem ser realizadas para identificar a influência da expressão de SOX3 na proliferação e sobrevivência de melanócitos neoplásicos. Em outros estudos, que avaliaram a viabilidade das células utilizando o método de MTT, observou-se que, em nas linhagens U87 e U251, de glioblastoma a alta expressão de SOX3 está associado a uma maior viabilidade das células (Vicentic *et al.*, 2018).

Na avaliação da expressão de genes envolvidos na TEM, foi possível observar que a transfecção de SOX3 pode desempenhar um papel na regulação da expressão gênica dentro das células. As células SK-MEL-28 que expressam SOX3 mostraram uma regulação negativa dos níveis de mRNA de E-caderina e uma regulação positiva dos níveis de mRNA de N-caderina.

Quando observado o papel da SOX3 em genes associados a TEM, foi visto que estudos utilizando a linhagem celular MG63 de osteossarcoma, quando há um aumento da SOX3 ocorre uma diminuição de E-caderina e um aumento de N-caderina, enquanto na linhagem U2OS ocorre um aumento da expressão de E-caderina e uma diminuição na expressão de N-caderina (Qiu *et al.*, 2017). Demonstrando que a expressão de SOX3 pode gerar resultados diferentes dependendo do tipo de tumor e de suas características.

Além dos achados de E-caderina e N-caderina, foi observado um aumento na expressão de mRNA de Snail nas células transfectadas com o vetor de expressão para SOX3. Possivelmente, a SOX3 está associada a essa interação regulatória Snail-E-caderina em melanomas. Nossos resultados são compatíveis com esse comportamento. O aumento da expressão de Snail pode ser associado ao fato de que os genes do subgrupo

de SoxB1 sejam comumente caracterizados como ativadores transcricionais (Uchikawa; Kamachi; Kondoh, 1999). Em contraste aos nossos resultados, um estudo utilizando uma linhagem celular de melanoma demonstrou que quando há expressão de Snail nas células, a expressão de SOX3 é mais baixa. (Acloque *et al.*, 2011) No entanto, em estudos utilizando linhagens de osteossarcoma a expressão de Snail também era regulada positivamente quando comparada com as células controle (Guo *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2017).

A expressão de SOX3 reduziu a migração das células SK-MEL-28. Esse perfil menos invasivo, não foi visto em outros tumores. Na linhagem MG63 de osteossarcoma, o aumento da expressão de SOX3 foi associado a uma maior migração das células (Qiu *et al.*, 2017). Na linhagem ECA109 de carcinoma esofágico o silenciamento de SOX3 reduziu a migração das células (Cai *et al.*, 2016)

Nossos resultados indicam que a expressão de SOX3 em melanomas pode contribuir para as mudanças fenotípicas associadas à TEM e a migração das células. Sua conexão com Snail no melanoma pode destacar seu papel como alvo terapêutico promissor para se tornar um biomarcador molecular no contexto do melanoma.

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo auxilia na compreensão da ação do fator de transcrição SOX3 nos principais marcadores do processo TEM em células de melanoma humano. Os achados demonstram que o fator de transcrição SOX3 pode contribuir para as mudanças fenotípicas associadas à TEM e ao controle da migração celular, mediada pela regulação negativa dos marcadores E-caderina e N-caderina, possivelmente associado à regulação positiva de Snail. Podemos concluir que a SOX3 influencia a TEM na linhagem celular SK-MEL-28, o que abre oportunidade de estudos que explorem o seu potencial como alvo prognóstico e terapêutico, no manejo desse câncer agressivo.

9 REFERÊNCIAS

- (IARC), International Agency For Research On Cancer. Cancer today. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 07 dez. 2023.
- (IARC), International Agency For Research On Cancer. Cancer tomorrow. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?cancers=16&single_unit=10000. Acesso em: 07 dez. 2023.
- ABADI, A. J. *et al.* The role of SOX family transcription factors in gastric cancer. *International Journal Of Biological Macromolecules*, v. 180, p. 608-624, 2021.
- ACLOQUE, H.; OCAÑA, O. H.; MATHEU, A.; RIZZOTI, K.; *et al.* Reciprocal Repression between Sox3 and Snail Transcription Factors Defines Embryonic Territories at Gastrulation. *Developmental Cell*, v. 21, n. 3, p. 546-558, 2011.
- ATCC. SK-MEL-28. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/htb-72>. Acesso em: 25 mar. 2024.
- ATLAS, The Human Protein. Sox3. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134595-SOX3/subcellular#human>. Acesso em: 18 dez. 2023.
- BALCH C.M. *et al.* Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* v. 19, n. 16, p. 3635-48, 2001.
- BELOTE, R. L. *et al.* Human melanocyte development and melanoma dedifferentiation at single-cell resolution. *Nature Cell Biology*, v. 23, n. 9, p. 1035-1047, 2021.
- BOLICK, N.L.; GELLER, A.C. Epidemiology of Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* V. 35, n. 1, p. 57-72, 2021.
- CAI, Q. Y.; LIANG, G.Y.; ZHENG, Y.F; *et al.* Sox3 silencing inhibits metastasis and growth of esophageal squamous cell carcinoma cell via Downregulating GSK-3 β . *Int J Clin Exp Pathol.* v. 9 n. 3. P. 2939–2949. 2016.
- CÂNCER, Instituto Nacional de. Câncer de pele melanoma. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>. Acesso em: 07 dez. 2023.
- CASTILLO, S. D.; SANCHEZ-CESPEDES, M. The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opinion On Therapeutic Targets*, v. 16, n. 9, p. 903-919, 2012.
- CHEN, T. *et al.* Epithelial–mesenchymal transition (EMT): a biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *Journal Of Cellular Physiology*, v. 232, n. 12, p. 3261-3272, 2017.
- Conselho Editorial de Tratamento para Adultos PDQ. Tratamento de Melanoma PDQ. Bethesda, MD: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/skin/paciente/melanoma-tratamento-pdq>. Acessado em: 05/01/2024

- CUI, K.; ZHANG, H.; WANG, G.-Z. MiR-483 suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis by targeting SOX3 in breast cancer. *European Review For Medical And Pharmacological Sciences*, v. 23, n. 5, p. 2069-2074, 2019.
- DAVIS, L. E.; SHALIN, S. C.; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*, v. 20, n. 11, p. 1366-1379, 1 ago. 2019.
- DEBNATH, P.; HUIREM, R. S.; DUTTA, P.; PALCHAUDHURI, S. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors. *Biosci Rep*, v. 42, n. 1, 2022.
- DEHSHAHRI, A. *et al.* Editing SOX Genes by CRISPR-Cas: current insights and future perspectives. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 22, n. 21, p. 11321, 2021.
- DONG, C.; WILHELM, D.; KOOPMAN, P. Sox genes and cancer. *Cytogenetic And Genome Research*, v. 105, n. 2-4, p. 442-447, 2004.
- DZWIERZYNSKI, W. W. Melanoma Risk Factors and Prevention. *Clinics In Plastic Surgery*, v. 48, n. 4, p. 543-550, 2021.
- ELDER, D. E. *et al.* The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Archives Of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 144, n. 4, p. 500-522, 2020.
- GILBERT, Scott F.. *Developmental biology*. 6. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.
- GONZALEZ, D. M.; MEDICI, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, v. 7, n. 344, 2014.
- GRIMM, D. *et al.* The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Seminars In Cancer Biology*, v. 67, p. 122-153, 2020.
- GUO, Yanjie; YIN, Jimin; TANG, Mingjie; YU, Xingang. Downregulation of SOX3 leads to the inhibition of the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells. *International Journal Of Oncology*, v. 52, n. 4, p. 1277-1284, 2018.
- HAO, L.; HA, J.R.; KUZEL, P.; GARCIA, E.; PERSAD, S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *British Journal Of Dermatology*. v. 166, n. 6, p. 1184-1197, 2012.
- HU, J.; LI, K.; Li, Z.; GAO, C.; GUO, F.; WANG, Y.; XUE, F. Sex-determining region Y box-containing genes: regulators and biomarkers in gynecological cancers. *Cancer Biology & Medicine*, v. 16, n. 3, p. 462-474, 2019.
- JOHNSON, J. P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer And Metastasis Reviews*. v. 18, n. 3, p. 345-357, 1999.
- KASZAK, I.; *et al.* Role of Cadherins in Cancer-A Review. *Int J Mol Sci*. v. 21, n. 20, p. 7624, 2020.

- LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 3, p. 178-196, 2014.
- LI, C.; KUAI, L.; CUI, R.; MIAO, X. Melanogenesis and the Targeted Therapy of Melanoma. *Biomolecules*, v. 12, n. 12, p. 1874, 2022.
- LI, K. *et al.* Overexpression of Sox3 is Associated with Diminished Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Annals Of Surgical Oncology*, v. 20, n. 3, p. 459-466, 2013.
- MA, W. *et al.* Dermokine mutations contribute to epithelial-mesenchymal transition and advanced melanoma through ERK/MAPK pathways. *PLoS One*, v. 18, n. 7, 2023.
- MARCONI, Alessandra; QUADRI, Marika; SALTARI, Annalisa; PINCELLI, Carlo. Progress in melanoma modelling in vitro. *Experimental Dermatology*, v. 27, n. 5, p. 578-586, 2018.
- MICHIELON, Elisabetta; GRUIJL, Tanja D. de; GIBBS, Susan. From simplicity to complexity in current melanoma models. *Experimental Dermatology*, v. 31, n. 12, p. 1818-1836, 2022.
- PEARLMAN, R. L. *et al.* Potential therapeutic targets of epithelial–mesenchymal transition in melanoma. *Cancer Letters*, v. 391, p. 125-140, 2017.
- PEDRI, D. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *The Febs Journal*, v. 289, n. 5, p. 1352-1368, 2021.
- POUREMAMALI, F. *et al.* The role of SOX family in cancer stem cell maintenance: with a focus on sox2. *Pathology - Research And Practice*, v. 231, 2022.
- QIU, M. *et al.* Sex-determining region Y-box protein 3 induces epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cells via transcriptional activation of Snail1. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 36, n. 1, 2017.
- RASTRELLI, M. *et al.* Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, v. 6, n. 28, p. 1005-1011, 2014.
- RÖTZER, V. *et al.* Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 136, n. 1, p. 301–310, 2016.
- SCHADENDORF, D. *et al.* Melanoma. *Nat Rev Dis Primers*. v. 1, n. 1, 2015.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.
- SCOLYER, R.A.; RAWSON, R.V.; GERSHENWALD, J.E.; FERGUSON, P.M.; PRIETO, V.G. Melanoma pathology reporting and staging. *Mod Pathol*. v.33, n. 1, p. 15-24, 2020.
- SERRANO-GOMEZ, S.J.; MAZIVEYI, M.; ALAHARI, S.K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer*. v. 15, n. 18. 2016.

- SHAKHOVA O. *et al.* Antagonistic cross-regulation between Sox9 and Sox10 controls an anti-tumorigenic program in melanoma. *PLoS Genet.* v. 11, n. 1, 2015.
- SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 14, n. 10, p. 611-629, 2017.
- SILVA, F. H. D.; UNDERWOOD, A.; ALMEIDA, C. P. *et al.* Transcription factor SOX3 upregulated pro-apoptotic genes expression in human breast cancer. *Medical Oncology*, v. 39, n. 12, 2022.
- SLOMINSKI, R. M. *et al.* Melanoma, Melanin, and Melanogenesis: The Yin and Yang Relationship. *Front Oncol*, v. 12, 2022.
- SREENIVASAN, R.; GONEN, N.; SINCLAIR, A. SOX Genes and Their Role in Disorders of Sex Development. *Sexual Development*, v. 16, n. 2-3, p. 80-91, 2022.
- STEVANOVIC, M. *et al.* SOX Transcription Factors as Important Regulators of Neuronal and Glial Differentiation During Nervous System Development and Adult Neurogenesis. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, v. 14, 2021.
- TANG, Y. *et al.* EMT-Inducing Transcription Factors, Drivers of Melanoma Phenotype Switching, and Resistance to Treatment. *Cancers*, v. 12, n. 8, p. 2154, 2020.
- TEIXIDO, C.; CASTILLO, P.; MARTINEZ-VILA, C.; ARANCE, A.; ALOS, L. Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells*. v. 10 n. 9, p. 2320, 2021.
- THU, K. L. *et al.* SOX15 and other SOX family members are important mediators of tumorigenesis in multiple cancer types. *Oncoscience*, v. 1, n. 5, p. 326-335, 2014
- TÍMÁR J.; LADÁNYI, A. Molecular Pathology of Skin Melanoma: Epidemiology, Differential Diagnostics, Prognosis and Therapy Prediction. *Int J Mol Sci.* v. 23, n. 10, 2022.
- UCHIKAWA, M.; KAMACHI, Y.; KONDOH, H. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mechanisms Of Development*, v. 84, n. 1-2, p. 103-120, 1999.
- VICENTIC, J. M. *et al.* SOX3 can promote the malignant behavior of glioblastoma cells. *Cellular Oncology*, v. 42, n. 1, p. 41-54, 2019.
- WANG, Y.; SHI, J.; CHAI, K.; YING, X.; ZHOU, B. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* v. 13, n. 9, p. 963-972, 2013.
- XIA, Yu; PAPALOPULU, Nancy; VOGT, Peter K.; LI, Jian. The oncogenic potential of the high mobility group box protein Sox3. *Cancer Research*, v. 60, n. 22, p. 6303-6306, 2000.
- ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A.. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers Of Medicine*, v. 12, n. 4, p. 361-373, 2018.
- WANG, Z. *et al.* Melanocyte stem cells in skin diseases and their potential in cell-based therapy. *Histology And Histopathology*, v. 37, n. 10, p. 937-953, 2022

XIA, Y. *et al.* The oncogenic potential of the high mobility group box protein Sox3. *Cancer Research*, v. 60, n. 22, p. 6303-6306, 2000.

ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers Of Medicine*, v. 12, n. 4, p. 361-373, 2018.

10 ANEXOS

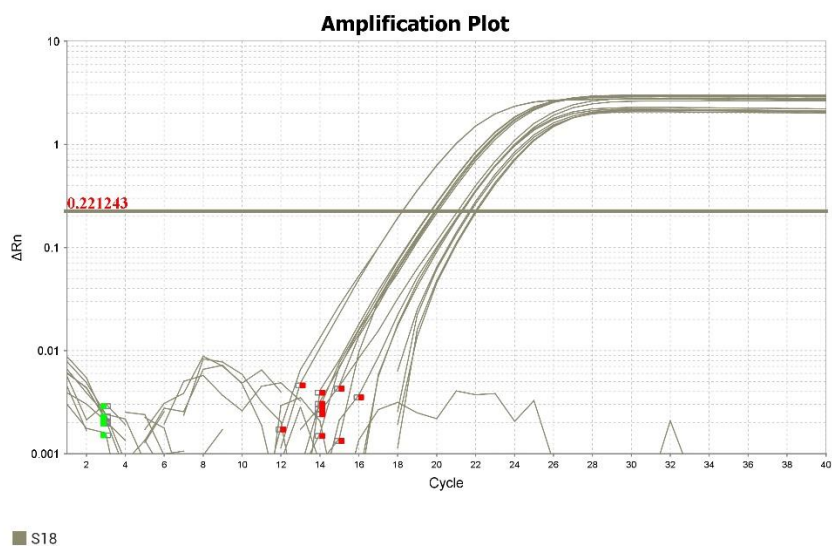


Figura 16 - Amplificação do gene de S18. A qPCR foi feita em duplicata para cada grupo. A linha representa o CT.

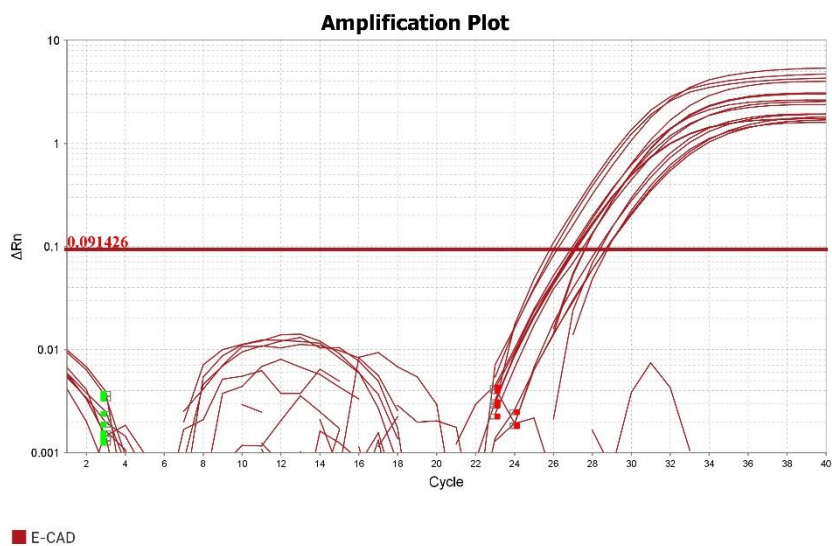


Figura 17 - Amplificação do gene E-cad (CDH1). A qPCR foi feita em duplicata para cada grupo. A linha representa o CT.

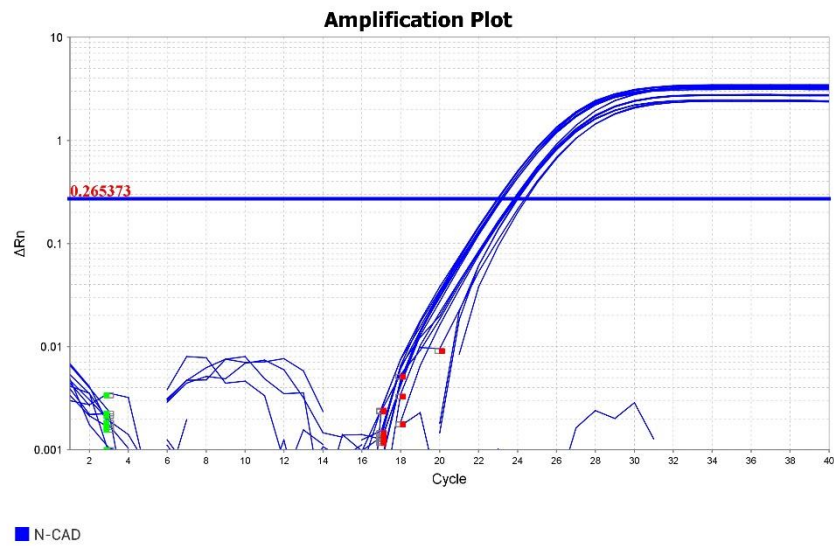


Figura 18 - Amplificação do gene N-cad (CDH2). A qPCR foi feita em duplicata para cada grupo. A linha representa o CT.

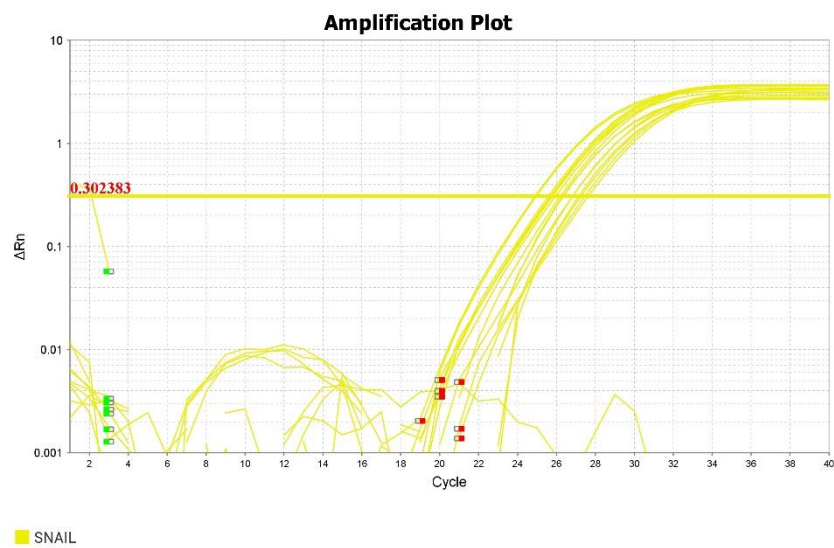


Figura 19 - Amplificação do gene Snail. A qPCR foi feita em duplicata para cada grupo. A linha representa o CT.